



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

Projektträger Umweltchemikalien

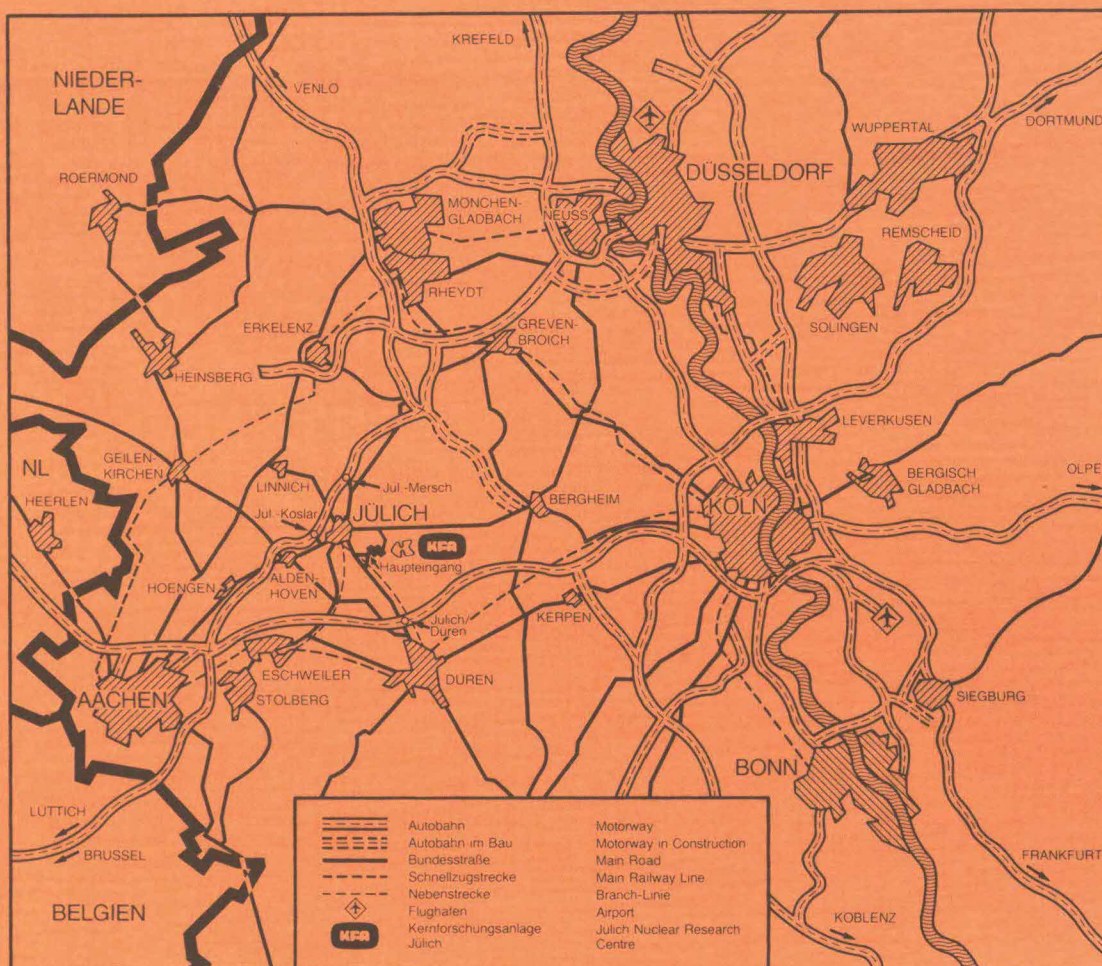
**Methoden zur
ökotoxikologischen Bewertung
von Chemikalien**

**Band 4:
Zellkulturen und Membraneffekte
Bericht 1979 – 1983**

Herausgeber:

F. Führ, E. Stüttgen, B. Scheele

**Jül-Spez - 272
September 1984
ISSN 0343-7639**



Als Manuskript gedruckt

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich – Nr. 272

Projekträger Umweltchemikalien Jül-Spez-272

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 19 13 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 02461/610 · Telex: 833556-0 kf d

**Methoden zur
ökotoxikologischen Bewertung
von Chemikalien**

**Band 4:
Zellkulturen und Membraneffekte
Bericht 1979 – 1983**

Herausgeber:

F. Führ, E. Stüttgen, B. Scheele

Kurzfassung

Seit 1978 fördert der BMFT Forschungsarbeiten zum Projekt "Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien". Ziel dieser Arbeiten ist die Entwicklung, Verbesserung, Erprobung und Standardisierung von Verfahren zur ökotoxikologischen Prüfung von Umweltchemikalien. In einer Arbeitsgruppe wurden Testmethoden zum Studium der Aufnahme, des Abbaus und der Persistenz von Chemikalien in Pflanzen entwickelt.

In drei Forschungsberichten werden Arbeiten vorgestellt, die die Eignung pflanzlicher Zellkulturen (im Vergleich zum komplexen System Boden-Pflanze) als Testsystem für eine kurzfristige Beurteilung des Umwandlungs- und Abbauverhaltens von Chemikalien untersucht. Um die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse aus dem zu entwickelnden Schnelltest zu sichern, wurde dieser in Form eines Ringtests überprüft. Einzelheiten zur Ausführung des Tests sind in einem "Richtlinienentwurf" beschrieben.

Summary

Since 1978 the Minister of Science and Technology has supported the research program "Methods to Evaluate Ecotoxicological Effects of Chemicals" in order to develop, improve, check and standardize procedures to test environmental chemicals under ecotoxicological aspects.

A group of three laboratories has developed testing methods to study uptake, degradation, and persistence of chemicals in plants. The results of their research presented in the following report relate to the suitability of plant cell cultures as a short term testing procedure to evaluate the metabolism and degradation of chemicals in comparison to the soil-plant system. Reliability and reproducibility of the method was proven within a ring test procedure. Experimental details have been described in the attached draft of a guideline.

Inhalt

	Seite
1. Einleitung	1
2. Liste der Referenzchemikalien	4
3. Projektübersichten	5
3.1 Finanzübersicht	5
3.2 Thematische Übersicht	6
4. Forschungsberichte "Zellkulturen und Membran- effekte"	7
4.1 Harms, Langebartels; Braunschweig	7
4.2 Sandermann; Freiburg	23
4.3 Schuphan, Haque, Ebing; Berlin	29
4.4 Ebing, Harms, Sandermann; Gemeinschafts- bericht	45
4.5 Richtlinienentwurf	67

1. Einleitung

Der vorliegende Bericht enthält Ergebnisse des Forschungsprogramms "Methoden zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien". Dieses wurde 1977 gemeinsam von dem Bundesminister für Forschung und Technologie (BMFT) und dem Bundesminister des Inneren (vertreten durch das Umweltbundesamt) ausgeschrieben und wird seit 1978 durch den BMFT finanziert. Allgemeines Förderziel ist die Entwicklung von Methoden zur Erfassung, Bewertung und Kontrolle von chemischen Umweltbelastungen, damit Schäden und Nachteile aus menschlichen Eingriffen in ökologische Systeme reduziert werden können. Daraus leiten sich die beiden Teilaufgaben des Projektes ab:

- Prüfmethoden und -verfahren zur Feststellung der lokalen und allgemeinen Umweltbelastung durch Chemikalien und
- Modelle zur Planung und Überwachung von ökologischen Systemen zu entwickeln.

Das Forschungsprogramm wurde begleitend zu der Chemikaliengesetzgebung in der Bundesrepublik Deutschland und ähnlichen Aktivitäten der Europäischen Gemeinschaft konzipiert. Im Hinblick auf die hierin vorgesehene Bewertung der Umweltgefährlichkeit von "neuen Stoffen" sollen im Rahmen des Projektes neue Teststrategien und -methoden zur Abschätzung der Umweltwirkungen von Chemikalien erarbeitet und beschriebene verbessert, vereinfacht und standardisiert werden.

Das Umweltverhalten wird durch eine Vielzahl von Eigenschaften bestimmt. Die Arbeiten befassen sich daher mit einem breiten Spektrum von unter dem Begriff "Ökotoxikologie" subsumierten Verhaltensmustern. Diese reichen von der Toxizität, Abbaubarkeit/Persistenz und Akkumulation bis zur Verlagerung innerhalb und zwischen verschiedenen Umweltkompartimenten. Dementsprechend werden verschiedene Ausschnitte aus aquatischen und terrestrischen Lebensräumen sowie der Atmosphäre betrachtet. Innerhalb dieser Kompartimente werden biotische und abiotische Wechselwirkungen untereinander und zwischen Umweltchemikalien anhand verschiedener Testgrößen untersucht.

Mit den vielfältigen experimentellen Ansätzen sollen folgende Aufgaben gelöst werden:

- Entwicklung, Verbesserung, Vereinfachung und Standardisierung von Prüfverfahren zu erproben,
- den Aussagewert einer Methode exakt abzugrenzen, da jede Methode nur einen Ausschnitt aus einem Verhaltensmuster simuliert,
- verschiedene, voneinander unabhängige Untersuchungsverfahren (zur Ermittlung derselben Eigenschaft) zu vergleichen,
- die ökologische Relevanz von Teststrategien und -methoden zu ermitteln.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Einzelvorhaben zu erreichen, wurden 1978 von einem ad-hoc Ausschuß des BMFT beim Projektträger 26 Referenzchemikalien (s. Tab. S. 4) ausgewählt (Referenzchemikalien als Hilfsmittel zur Auswertung eines Forschungsprogramms - Ziele und Kriterien für die Auswahl (B. Scheele, Chemosphere 9, 293-309, 1980)). Zumindest thematisch aneinandergrenzende Vorhaben werden so durch Bearbeitung gleicher Chemikalien verbunden. Es wird erhofft,

- die im Hinblick auf die genannte Zielsetzung erforderliche Vergleichbarkeit der Vorhaben zu erreichen,
- einen Gesamtüberblick und vertiefte Informationen über das Verhalten einer Chemikalie zu gewinnen, indem die Ergebnisse nach dem Prinzip von Testbatterien aneinandergereiht werden können,
- Hinweise auf Zusammenhänge zwischen physikalisch-chemischen Stoffeigenschaften und dem Verhalten von Chemikalien in der Umwelt zu erhalten,
- einen Beitrag zur Lösung der Probleme, die bei der Prüfung "neuer Chemikalien" nach dem Chemikaliengesetz und dessen Ausführungsverordnungen entstehen, zu leisten.

Die allgemeine Charakterisierung dieser 26 Referenzchemikalien, ihre umweltrelevanten Daten (Produktionsmenge, Mobilität, Persistenz, Akkumulation und Schadwirkung), ihr Vorkommen in der Umwelt, Angaben zur Analytik sowie eine

Literaturübersicht finden sich in den Merkblätter über Referenzchemikalien der Projektträgerschaft Umweltchemikalien. Die Firma Riedel de Haen AG bietet unter dem Stichwort "OEKANAL-Referenzchemikalien" 21 dieser ausgewählten Standards mit einem Reinheitsgrad über 98 % an. Angaben über die Verunreinigungen sowie weitere Spezifikationen können über den Projektträger zur Verfügung gestellt werden.

Im Band 1 der "Methoden zur Ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien" wurden Ergebnisse aus Untersuchungen zum Abbauverhalten, zur Bioakkumulation und Elimination von Chemikalien in verschiedenen aquatischen Systemen vorgestellt. Im Band 2 werden 5 abgeschlossene Arbeiten aus dem Themenbereich "Böden und Modellsysteme" zusammengefaßt, der Band 3 enthält Forschungsberichte zur Thematik "Terrestrische Systeme". Der vorliegende Band 4 aus dem Themenbereich "Zellkulturen und Membraneffekte" enthält Ergebnisse aus 3 Forschungsprojekten, in denen die Eignung pflanzlicher Zellkulturen als leicht zu handhabende Schnelltestsysteme für eine ökotoxikologische Bewertung von Chemikalien untersucht wird. Alle Bände sind bei der Zentralbibliothek der KFA-Jülich GmbH, Postfach 1913, D-5170 Jülich 1 erhältlich.

Der einleitenden Finanzierungsübersicht sind Förderungszeitraum und Bewilligungssumme der abgeschlossenen Vorhaben zu entnehmen.

Liste der als Referenzchemikalien ausgewählten
Substanzen

SYSTEMATISCHE BEZEICHNUNG	ABK. u. ANDERE CHEM. BEZEICHNUNG
Hexachlorbenzol	HCB, Perchlorbenzol
1.1.1-Trichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthan	DDT, Dichlor-diphenyl-trichlor- äthan
1.1-Dichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthan	DDD, Tetrachlordiphenyläthan
1.1-Dichlor-2.2-bis (4-chlorphenyl)-äthylen	DDE, 1,1-bis-(4-chlorphenyl- äthan
Di-(2-äthylhexyl)-phthalat	DOP
Carbonyldiamid	Harnstoff
Perylen	
Fluoranthren	
Benzol	
Toluol	
Phenol	
2-Nitrophenol; 4-Nitrophenol	
Pentachlorphenol	PCP
Anilin	
p-Chloranilin	
Na-Dodekylbenzolsulfonat	LAS, Marlon A ^R ca. 12 Typen
Dichlorphenoxyessigsäure	2,4-D
Trichlorphenoxyessigsäure	2,4,5-T
2-Äthylamino-4-chlor-6- (2-propyl-amino)-1.3.5-triazin	Atrazin
HgCl ₂	
Methanol	
Äthylacetat	
Trichloräthylen	
Äthylen	
1,2,4-Trichlorbenzol	

3.1 Finanzübersicht

KENN- ZEICHEN	DURCHFÜHRENDE STELLE VORHABENLEITER	THEMA	FÖRDERSUMME IN TDM JAHR GESAMT	LAUFZEIT
03 7271	FAL Braunschweig H. HARMS	Pflanzliche Zellsuspensionskul- turen als System zum Studium des Abbauverhaltens von Chemikalien in Pflanzen	1979: 37,8 1980: 45,7 1981: 98,4 1982: 105,7 1983: 117,0	01.01.79 - 31.12.83
03 7270	Universität Freiburg H. SANDERMANN	Umweltchemikalien in Pflanzen - Untersuchung von Aufnahme und Abbau in pflanzlichen Zell- kulturen	1979: 147,0 1980: 159,2 1981: 198,9 1982: 257,5 1983: 162,0	01.01.79 - 31.12.83
03 7272	BBA Braunschweig W. EBING	Schnellverfahren zur Beurteilung des Abbaus von Chemikalien durch standardisierte pflanzliche Ge- webekulturen	1979: 129,3 1980: 171,7 1981: 152,2 1982: 139,3 1983: 10,5	01.02.79 - 31.01.83

3.2 Thematische Übersicht

Kenn- zeichen	Problemstellung	(Referenz-) Chemikalien	Seite
03 7271	Eignung pflanzlicher Zellkulturen als Testsystem für eine ökotoxikologische Bewertung von Chemikalien	Harnstoff, 2,4-D DEHP, PCP, PAH's	7
03 7270	Einsatz pflanzlicher Zellkulturen zum Studium des Metabolismus von Umweltchemikalien	2,4-D, 2,4,5-T, DDT, DDE, DDA, HCB, PCP, Benzo (α)pyren, DOP	23
03 7272	Schnellverfahren zur Beurteilung des Abbaus von Wirkstoffen durch standardisierte pflanzliche Zellkulturen	$^{14}\text{C}_{(2)}$ -2,4-D, PCP, DEHP, Dichlorfluorid, Lindan, Parathion, Monolinuron, DOP	29

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsbericht (03 7271)

Pflanzliche Zellsuspensionskulturen als System zum Studium
des Abbauverhaltens von Chemikalien in Pflanzen

von

Dr. H. Harms und Dr. C. Langebartels

Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde
der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)
Braunschweig-Völkenrode

Institutsleiter:

Prof. Dr. D. Sauerbeck

Juni 1984

Zusammenfassung

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Eignung pflanzlicher Zellkulturen als Testsystem für eine ökotoxikologische Bewertung von Chemikalien überprüft und mit intakten Pflanzen verglichen. In beiden pflanzlichen Systemen konnten qualitativ gleiche Metabolitfraktionen isoliert werden. Das standardisierte Zellkultursystem lieferte aber in wesentlich kürzerer Zeit und bei erleichtertem analytischen Aufwand reproduzierbare Ergebnisse. Es ist daher ein geeignetes Testsystem, um schnelle Aussagen über das stoffwechselphysiologische Verhalten von chemischen Verbindungen in Pflanzen zu erhalten.

Den Kulturen wurden sehr unterschiedlich polare Chemikalien appliziert: Harnstoff, 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D), Diethylhexylphthalat (DEHP), Pentachlorphenol (PCP) und verschiedene polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs). Alle Verbindungen - auch persistente - wurden in signifikantem Ausmaß metabolisiert. Die wesentlichen enzymatischen Reaktionen waren Konjugationen mit Zuckern und Aminosäuren. Bei allen Verbindungen und Kulturen traten - teilweise sehr hohe - Anteile in der Rückstandsfraktion auf.

Summary

The suitability of plant cell cultures as a test system for the ecotoxicological evaluation of chemicals was determined and compared with intact plants. Both plants and cell suspension cultures were able to metabolize the applied compounds by common metabolic pathways. Qualitatively the metabolites were the same in both systems. But cell cultures can more easily be standardized, and the results may be obtained much quicker with less analytical expense. They are therefore a useful system to get rapid evidence of the metabolic behaviour of environmental chemicals in plants.

Different polar chemicals like urea, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), diethylhexylphthalate (DEHP), pentachlorophenol (PCP), and various polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were added to the nutrient solutions of the cultures. All compounds, even the persistent ones, were metabolized to a certain degree. As a main enzyme reaction conjugates with sugars and amino acids were formed. All compounds and cultures showed partly high portions in the residue fraction.

1. Einleitung

Die steigende Belastung der Umwelt mit Chemikalien hat insbesondere in den letzten Jahren auch das Bewußtsein dafür geschärft, daß alle lebenden Organismen unbeabsichtigte Schädigungen erleiden, wenn sie langfristig selbst niedrigen Chemikaliendosen ausgesetzt werden. Eine die Umwelt absichernde Kontrolle und Prüfung der Chemikalien ist daher unumgänglich. Das Ziel der hier dargestellten Untersuchungen war die Entwicklung einer wenig aufwendigen Testmethode zur Bewertung des ökologischen Verhaltens von Chemikalien in pflanzlichen Systemen.

Insbesondere für Nahrungs- und Futterpflanzen besitzen Informationen über die Persistenz, den Abbau bzw. den Metabolismus von Chemikalien in Pflanzen für eine Qualitätsbeurteilung große Bedeutung. Als Ergänzung zu Untersuchungen mit intakten Pflanzen ist die Kultur von Zellen höherer Pflanzen als undifferenzierte Zellsuspensionskulturen in den letzten Jahren so weit entwickelt worden, daß sie als Modellsystem für Stoffwechseluntersuchungen exogen applizierter Chemikalien zur Verfügung steht (Harms, 1973; Sandermann et al., 1977; Mumma and Davidonis, 1983). Diese in flüssigen Nährmedien sich rasch vermehrenden Pflanzenzellen bieten gegenüber intakten Pflanzen zahlreiche Vorteile. Hier sind besonders die absolute Abwesenheit von Mikroorganismen, die rasche Aufnahme der den Nährlösungen zugesetzten chemischen Verbindungen und ihre unmittelbare Einbeziehung in den Stoffwechsel sowie die vergleichsweise hohe Konzentration von gebildeten Abbau- und Umwandlungsprodukten zu nennen, was die Isolierung und Identifizierung sehr erleichtert bzw. erst ermöglicht.

Der vorliegende Beitrag beschreibt zusammenfassend die Untersuchungen zu dem Stoffwechselverhalten von Chemikalien unterschiedlicher physikalisch-chemischer Eigenschaften und enthält ferner Ergebnisse, die mit einer im Ringtest erprobten Standardmethode (Scheel et al., 1984) an zwei Zellkulturen von Weizen und Sojabohnen erzielt wurden. Neben der Bestimmung der Phytotoxizität der Substanzen und der Identifizierung gebildeter Metabolite wurde ferner der Stoffwechsel in verschiedenen Pflanzenarten einer Pflanzenfamilie vergleichend untersucht sowie die Übertragbarkeit der mit Zellkulturen erzielten Befunde auf intakte Pflanzen überprüft.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturen und aseptisch kultivierte Pflanzen

Für die Untersuchungen wurden Zellsuspensionskulturen verschiedener Pflanzenarten mit besonderer Berücksichtigung ihrer Relevanz als Nahrungs- und Nutzpflanzen angelegt, wie z. B. von Weizen, Bohnen- und Betarüben-Arten, Gartenmelde und anderen Chenopodium-Varietäten. Die Anlage der Kulturen, die Kulturtechniken sowie die Zusammensetzung der Nährmedien und die Wachstumscharakteristika der Kulturen wurden bereits beschrieben (Harms, 1973, 1983). Bei einigen Zelllinien - insbesondere bei den im Ringtest verwendeten Weizen- und Sojakulturen - erfolgte die Subkultur unter definierten Bedingungen seit mehr als 10 Jahren, so daß die Kulturen als einheitliches, standardisiertes Versuchsmaterial gelten können.

Die Keimpflanzen von Weizen, Gartenmelde und Zuckerrübe wurden als Einzelpflanzen auf 30 ml Knop'scher Nährlösung unter aseptischen Bedingungen in einer Phytozelle angezogen. Die Temperatur betrug 18 °C, die Lichtintensität 16.000 Lux. Weitere technische Einzelheiten sind bei Harms (1981) beschrieben.

2.2 Chemikalien

Für die Untersuchungen wurden Testchemikalien mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften eingesetzt, die über einen weiten Bereich der n-Oktanol/Wasser-Koeffizienten verteilt waren:

Verbindung	Verteilungskoeffizient n-Oktanol/Wasser	log	Molarität bei Test
Harnstoff	0,001	3,0	$1,7 \cdot 10^{-5}$ M
2,4-Dichlorphenoxy- essigsäure (2,4-D)	37	1,57	$4,5 \cdot 10^{-6}$ M
Diethylhexyl- phthalat (DEHP)	9500	3,98	$2,6 \cdot 10^{-6}$ M
Pentachlorphenol (PCP)	$1,02 \cdot 10^5$	5,01	$3,75 \cdot 10^{-6}$ M
Perylen	$6,3 \cdot 10^6$	6,80	$4,0 \cdot 10^{-6}$ M

Strukturanaloga von Perylen wie Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)anthracen sowie weitere 3- und 4-Ringsysteme von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) wurden bei Harms (1981, 1983) beschrieben.

2.3 Standard-Testmethode und Experimente

Für die Untersuchungen des Abbauverhaltens von Chemikalien in pflanzlichen Zellkulturen wurde zusammen mit zwei Arbeitsgruppen der Universität Freiburg und der Biologischen Bundesanstalt Berlin ein Standardtest entwickelt und in Ringversuchen überprüft. Die Methode wird bei Ebing et al. (1984) detailliert beschrieben und hier nur kurz skizziert.

Soja- und Weizensuspensionskulturen wurden zu Ende der linearen Wachstumsphase für 48 h mit der zu testenden ^{14}C -markierten Substanz (ca. 1 μM , 0,5 μCi) inkubiert. Die Applikation erfolgte in Wasser nach Sterilfiltration, in Methanol oder als Liposomensuspension. Für die Bestimmung von möglicherweise freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$ und flüchtigen Metaboliten wurden die Kulturkolben mit sterilfiltrierter Preßluft belüftet und flüchtige Komponenten in einem Absorptionsgemisch aufgefangen. Nach Versuchsende wurden Zellen und Medium separiert und wie folgt aufgearbeitet. Die Zellen wurden in einem Lösungsmittelgemisch von Methanol/Chloroform/Wasser 2 : 1 : 0,8; Bligh and Dyer, 1959) mit einer Ultraschallsonde homogenisiert. Die nicht extrahierbaren Rückstände wurden abfiltriert. Die Nährmedien wurden mit einem Methanol/Chloroform-Gemisch (2 : 1) extrahiert. Aliquots der Zellextrakte und der Extrakte der Nährmedien wurden auf Kieselgel-Dünnschichtplatten aufgetragen und je nach Verbindung in geeigneten Laufmittelsystemen chromatographisch aufgetrennt. Die Laufmittelgemische wurden so gewählt, daß die applizierte Verbindung einen Rf-Wert von ca. 0,5 besaß; Metabolite mit geringerem Rf-Wert wurden als polar, Verbindungen mit einem Rf-Wert größer als 0,5 als unpolar definiert. Die Metabolite wurden weiterhin durch HPLC aufgetrennt, charakterisiert und mit MS oder GC/MS identifiziert (Harms, 1975, 1981, 1983; Langebartels und Harms, 1984 a/b). Die sehr unterschiedliche Polarität der Testchemikalien bedingte dabei spezifische Extraktions- und Aufarbeitungsverfahren, die im einzelnen bei der Besprechung der jeweiligen Verbindungen aufgeführt werden.

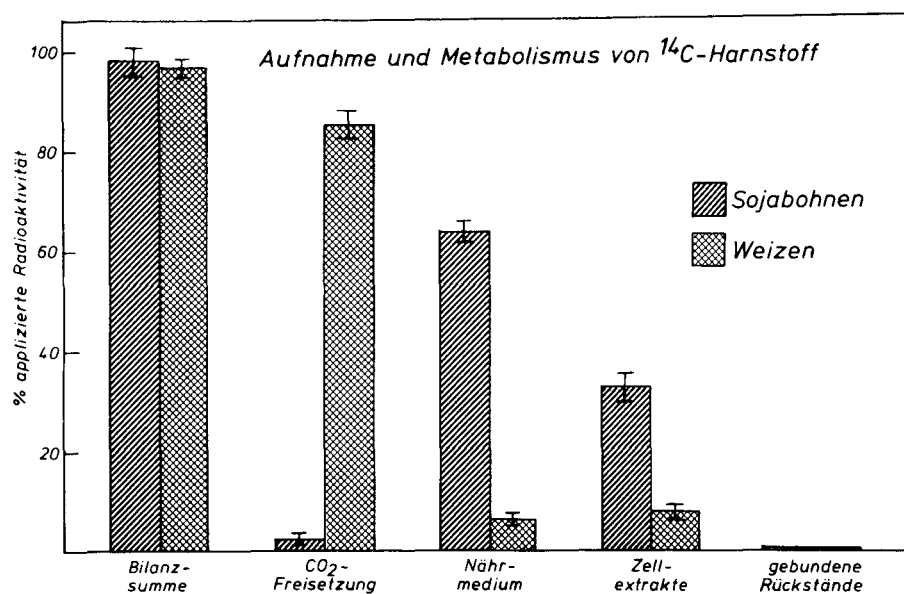
3. Ergebnisse

3.1 Harnstoff

Harnstoff ist mit einer Produktionsrate von 30 Mill. t/Jahr nicht nur mengenmäßig einer der bedeutendsten organischen Chemikalien, sondern wird aus Gründen der Energieeinsparung und verschiedener anwendungstechnischer Vorteile wegen als Dünger zunehmend eingesetzt. Pflanzliche Zellkulturen können mit Harnstoff als einziger N-Quelle kultiviert werden (Dougall, 1980).

Die Toxizität von Harnstoff wurde in Soja- und Weizenkulturen getestet. Bis zu einer Konzentration von 100 mg/l (1,7 mM) wurde in beiden Kulturen keine Beeinflussung des Wachstums gefunden, obwohl die Aufnahme und die Umsetzung von Harnstoff in den beiden Kulturen sehr unterschiedlich war.

Abbildung 1:



Metabolismus von ^{14}C -Harnstoff (1 mg/l) in Zellkulturen von Weizen- und Sojabohnen

Von der applizierten Harnstoffmenge wurden bei Weizen-Kulturen 72 % der Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt, während Soja-Zellen nur eine sehr geringe CO_2 -Freisetzung aufwiesen. Bei dieser Kultur befand sich die Hauptmenge der Radioaktivität (80 %) in der Nährlösung und 20 % in den Zellen, wo sie als Harnstoff unverändert isoliert werden konnte. Nimmt man als Maß für die Metabolisierung die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$, so errechnen sich für Weizen- und Soja-Kulturen Urease-Aktivitäten von 300 nmol bzw. 2 nmol pro Stunde und g Trockengewicht. Eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration von 1 mg/l (Standardtest-Bedingungen) auf 30 mg/l Nährlösung bewirkte bei *Phaseolus vulgaris*-Zellkulturen eine 35fache Steigerung der Ureaseaktivität. Eine weitere Erhöhung der Harnstoffkonzentration führte zu keiner weiteren Enzymaktivitätssteigerung. Als Nachweis der Ureaseaktivität wurde der spezifische Inhibitor Acetohydroxamsäure (AHA) eingesetzt. Eine Konzentration von 0,1 mM AHA senkte die Ureaseaktivität innerhalb 4 h um 15 %.

In weiteren Experimenten wurde der Ammonium- und Nitrat-Stickstoff der Nährlösungen von Weizen-Zellkulturen und Weizen-Keimpflanzen zu 20 %, 60 % bzw. 100 % durch ^{14}C - bzw. ^{15}N -markierten Harnstoff ersetzt. Diese vergleichenden Untersuchungen zeigten, daß Harnstoff sowohl von den Zellen als auch von den

intakten Pflanzen entsprechend dem applizierten Harnstoffanteil in den Nährmedien aufgenommen wurde. Höhere Harnstoffgaben führten bei beiden pflanzlichen Systemen zu geringeren Frischgewichtsgehalten, aber höheren Trockensubstanzgewichten. Dies läßt auf eine Beeinflussung des Wasserhaushaltes durch Harnstoff schließen. In den Weizen-Zellkulturen lag der Harnstoff überwiegend in unveränderter Form vor - nur bei höheren Gaben wurde ein Teil metabolisiert -, während im Sproß der Pflanzen, wo die Hauptmenge des assimilierten ¹⁵N gemessen wurde, kein Harnstoff mehr nachweisbar war.

Die gesteigerten Harnstoffgaben wirkten sich auch auf den Gehalt an Polyaminen in den Zellen aus. Wurden bei Weizen- und Bohnen-Zellkulturen sukzessive der Gehalt des Nährmediums an Nitrat-N durch Harnstoff-N ersetzt, so konnte eine lineare Erhöhung des Putrescingehaltes in den Zellen gemessen werden.

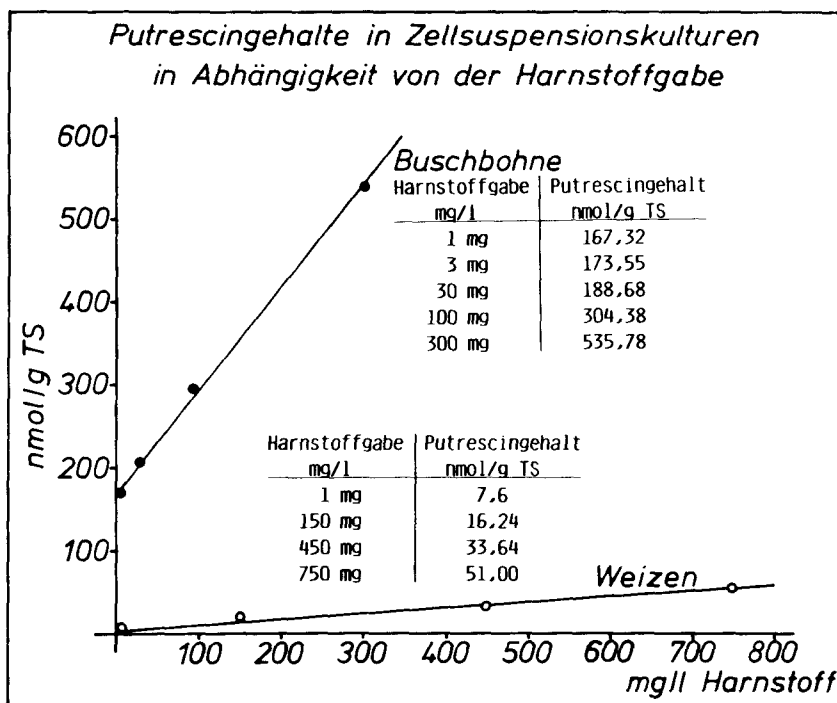


Abbildung 2:

Putrescingehalte in Bohnen- und Weizen-Zellkulturen in Abhängigkeit von der Harnstoffgabe

Die Polyamine wurden dabei mit Dansylchlorid derivatisiert, auf einer Reversed-Phase-Säule mit der HPLC aufgetrennt und mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors quantitativ erfaßt.

3.2 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure

2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) wird als Herbizid verwendet und ist als synthetisches Auxin Bestandteil vieler Zellkulturmedien. Untersuchungen mit Weizen- und Sojabohnen nach der Standard-Testmethode zeigten, daß sich monokotyle und dikotyle Zellkulturen gegenüber 2,4-D sehr unterschiedlich verhalten. Während Weizenkulturen 80 - 90 % des applizierten 2,4-D (1 mg/l)

aufnahmen, konnten in den Sojabohnen-Kulturen nur ca. 20 % der Radioaktivität in den Zellen gemessen werden. Nach Extraktion und chromatographischer Analyse ergab sich die in der Abb. 3 dargestellte Verteilung auf die verschiedenen Metabolitfraktionen.

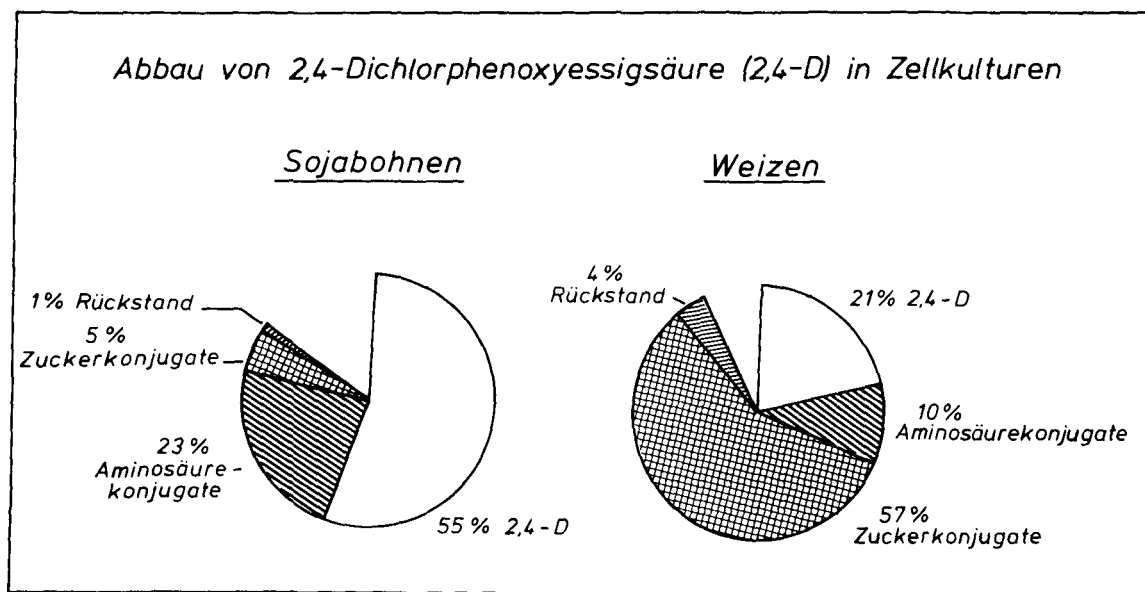


Abbildung 3: Abbau von 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) in Zellkulturen

In den Soja-Zellen lag 2,4-D noch zum überwiegenden Anteil als freie unveränderte Verbindung vor. Ferner wurden im Gegensatz zur Weizenkultur nur geringe Mengen an Zuckerkonjugaten gebildet. Die Hauptmetabolitfraktion bei Soja waren Aminosäurekonjugate.

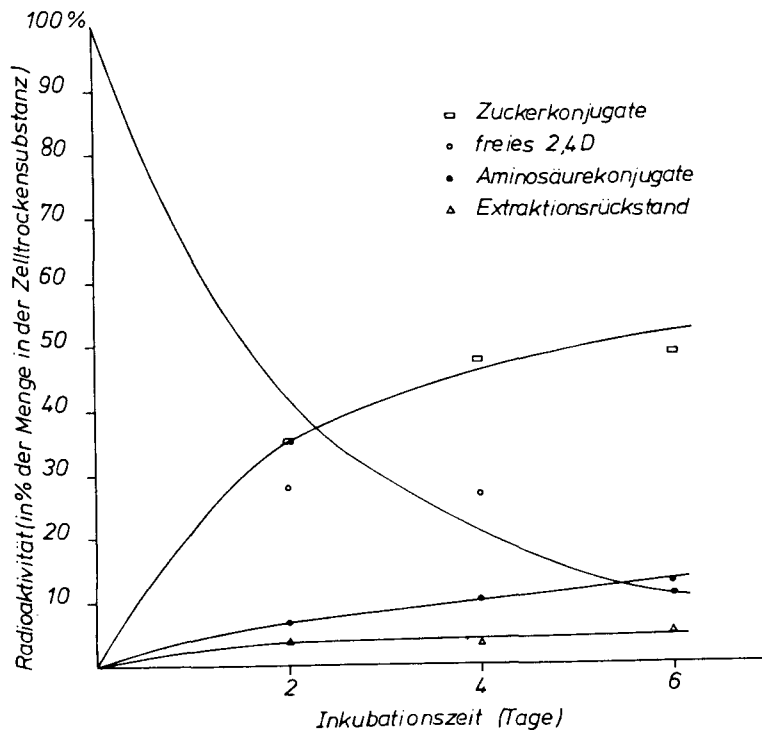
In weiteren Experimenten wurde der Einfluß der Inkubationsdauer auf die Metabolitbildung verfolgt. Nach 12 Tagen Anzucht of B5-Medium wurden Weizenzellen in eine neue Nährlösung, die 2 mg [acetic-2-¹⁴C]-2,4-D/l enthielt, übertragen. Nach 2, 4 bzw. 6 Tagen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und analysiert. Als Ergebnis zeigte sich, daß mit zunehmender Inkubationszeit der Gehalt an Radioaktivität in den Zellen anstieg, die sich fast quantitativ mit 70 %igem Äthanol extrahieren ließ. Nur 3,5 - 5 % der applizierten Radioaktivität verblieb in einem nicht extrahierbaren Rückstand. Eine Fraktionierung der Radioaktivität im Alkoholextrakt zeigt Abb. 4.

Der Gehalt an freiem 2,4-D nahm mit zunehmender Inkubationsdauer ab, während gleichzeitig der Gehalt an Zuckerkonjugaten anstieg. Der Gehalt an Aminosäurekonjugaten veränderte sich bei längeren Inkubationszeiten nur unwesentlich. Aus den Befunden ergibt sich, daß 2,4-D in Weizen-Zellkulturen nach Metabolisierung weitgehend in Form von Glucosiden oder Zuckerresten festgelegt wird. Als Aglyka konnten nach Hydrolyse und Vergleich mit Referenz-

substanzen 4-OH-2,5-D und 4-OH-2,3-D isoliert und identifiziert werden.

Abbildung 4:

Prozentuale Verteilung der Radioaktivität auf die verschiedenen Metabolitfraktionen von Weizen nach 2, 4 und 6 Tagen Inkubation mit 2,4-D



3.3 Diethylhexylphthalat

Diethylhexylphthalat (DEHP) wird als Weichmacher in der Kunststoffproduktion eingesetzt und findet sich als Verunreinigung in allen Umweltbereichen. Die Verbindung ist in intakten Pflanzen nur schwer abbaubar. Krell und Sander-mann (1983) konnten eine Esterase aus Weizenkulturen isolieren, die spezi-fisch zu Monoethylhexylphthalat führt, aber keine Phthalsäure freisetzt.

Nach 48stündiger Inkubation mit $2,6 \mu\text{M}$ ^{14}C -DEHP fanden sich trotz der ge-ringen Wasserlöslichkeit der Substanz 60 - 73 % der applizierten Radioakti- vität in den Zellen wieder. Bei dem Standardtest wurden jeweils Kontroll- kulturen verwendet, die durch eine 10minütige Hitzebehandlung inaktiviert wurden. Diese Kulturen zeigten, wie auch in anderen Fällen, in denen lipo- phile Substanzen getestet wurden, eine hohe Adsorption der Radioaktivität an die Membranstrukturen, aber nur einen geringen Umsatz.

In Sojakulturen wurden 20,1 % des ^{14}C -DEHP metabolisiert, in Weizenkulturen 24,4 %. In beiden Fällen bestand die Metabolitfraktion hauptsächlich aus Konjugaten, die sich z. T. mit β -Glucosidase spalten ließen. Polare Metabo- lite wurden bei Weizenkulturen zu 4,5 % in das Nährmedium transportiert.

DEHP zeigte bei Soja- und Weizenkulturen bis zu einer Konzentration von 10 mg/l keine phytotoxischen Wirkungen.

Tabelle 1: Metabolismus von Diethylhexylphthalat

Fraktion	% applizierte Radioaktivität Zellsuspensionskulturen		Radioaktivität Kontrolle/inaktivierte Zellen	
	Soja	Weizen	Soja	Weizen
Nährmedium	34,9	6,7	4,8	2,5
Zellextrakt	60,1	73,4	90,0	85,9
Rückstand	0,6	7,7	0,4	5,9
Bilanzsumme	95,6	87,8	95,2	94,3
nicht umgesetztes DEHP	74,8	55,3	93,8	87,9
polare Metabolite	20,1	24,4	1,2	1,1
unpolare Metabolite	0,0	0,4	0	0

3.4 Pentachlorphenol

Pentachlorphenol (PCP) und seine Salze wurden in großem Maße als Holzschutzmittel verwendet. Aufgrund ihrer antimikrobiellen, herbiziden und insektiziden Eigenschaften fanden sie darüber hinaus weitverbreitet Anwendung, hauptsächlich als Herbizid in Reiskulturen (Rao, 1978). Untersuchungen zum PCP-Stoffwechsel in Reispflanzen wurden von Weiss et al. (1982), in Weizen-Keimpflanzen und pflanzlichen Zellkulturen von Langebartels und Harms (1984, a, b) durchgeführt. Bis zu einer Konzentration von 10^{-6} molar/l Nährmedium ließen sich keine signifikanten Einflüsse durch PCP auf das Wachstum von Weizen-Keimpflanzen und -Zellkulturen nachweisen. Eine 50 %ige Wachstumshemmung trat bei Pflanzen und Zellkulturen bei einer Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ auf. PCP wurde in den heterotrophen Kulturen von Sojabohnen und Weizen sowie in photomixotrophen Kulturen von Lupinen überwiegend in Konjugate umgewandelt.

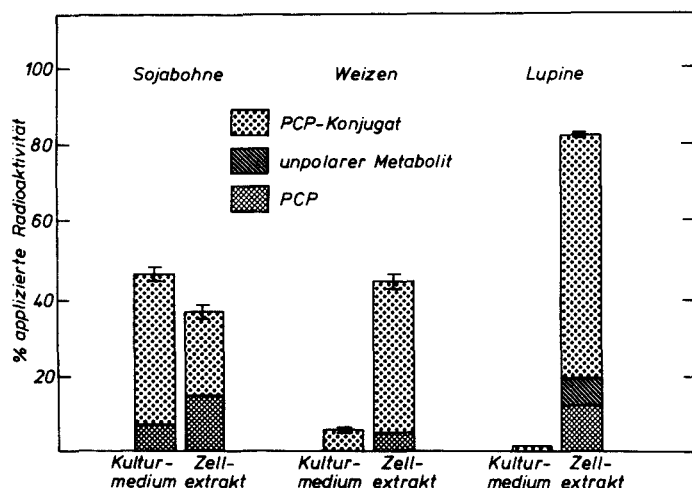


Abbildung 5:

Stoffwechsel von Pentachlorphenol in Zellsuspensionskulturen von Sojabohnen, Weizen und Lupinen

Sojazellen absorbierten bereits nach 3 Min. 70 - 80 % der angebotenen PCP-Menge. Bei längerer Inkubationsdauer wurde aber der überwiegende Anteil - zu 80 % in Form von Konjugaten - in das Medium abgegeben. Weizenkulturen wiesen nach 48 h Inkubation nur 4,5 % Radioaktivität im Nährmedium auf. Die Metabolitbildung lag bei Soja und Weizen zwischen 55 und 60 %. Lupinenkulturen wiesen eine unpolare Fraktion (8 %) auf, die mit Pentachloranisol co-chromatographierte. Vergleichende Untersuchungen mit Weizenpflanzen in Hydrokultur zeigten keine qualitativen Änderungen im Metabolitmuster. Die polare Konjugatfraktion stellte hier ebenfalls das Hauptumwandlungsprodukt dar.

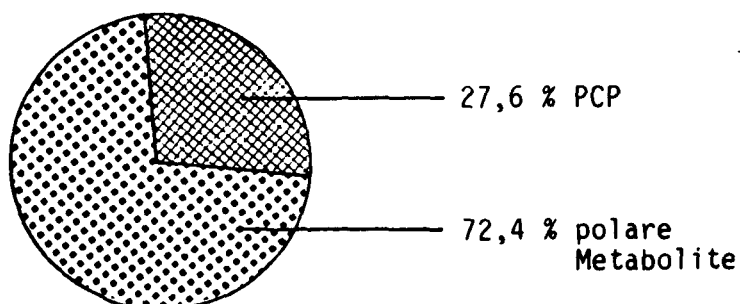


Abbildung 6:

Metabolismus von ^{14}C -PCP in aseptisch kultivierten Weizenpflanzen

Die Konjugatfraktion konnte mit Hilfe von TLC und HPLC aufgetrennt werden. Nach saurer Hydrolyse ließ sich PCP als einziges Aglykon freisetzen. β -Glucosidase spaltete 65 - 74 % der polaren Fraktion bei Sojazellen und 25 - 40 % bei Weizenkulturen. Ein Hauptbestandteil der Konjugatfraktion konnte durch GC/MS als PCP- β -D-Glucopyranosid nachgewiesen werden (Langebartels and Harms, 1984 b). Eine Bildung von Glucosiden trat bei Zellkulturen vorwiegend während der lag- und frühen linearen Wachstumsphase auf. Die Beteiligung einer Glucosyltransferaseaktivität für PCP konnte bei Sojakulturen auch in vitro aufgezeigt werden. Das PCP-Glucosid wurde synthetisiert und in gleichen Konzentrationen wie PCP Sojazellkulturen zugesetzt.

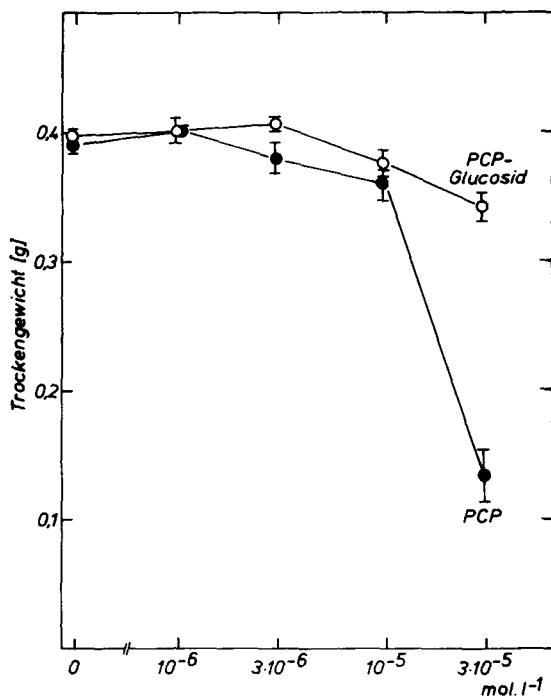


Abbildung 7:

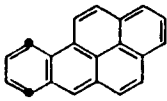
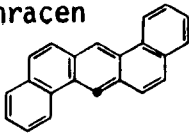
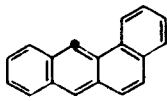
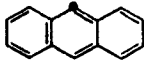
Toxizität von PCP und PCP-Glucosid

Die Toxizität von PCP wird durch die Glucosidbildung deutlich vermindert (Langebartels und Harms, 1984 b). Bei einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PCP trat eine 90 %ige Hemmung des Wachstums auf, während das PCP-Glucosid nur eine Hemmung von 10 % bewirkte.

3.5 Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) sind unbestritten die weitest verbreiteten Carcinogene in der menschlichen Umwelt. Die Belastung ist hauptsächlich auf industrielle Emissionen, Verbrennungs- und Autoabgase und ähnliche zivilisationsbedingte Ursachen zurückzuführen. Um einer möglichen Gefährdung der menschlichen Gesundheit (z. B. durch Verzehr kontaminierter pflanzlicher Nahrung) rechtzeitig zu begegnen, ist es notwendig zu wissen, ob Pflanzen PAHs aufnehmen, speichern oder gar in toxische Verbindungen umwandeln.

Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe unterschiedlicher Molekülgröße und -konfiguration wurden sowohl aseptisch kultivierten Keimpflanzen als auch Zellsuspensionskulturen verschiedener Nahrungspflanzen appliziert und deren Aufnahme und Umwandlung ermittelt (Harms, 1975, 1977, 1981, 1983; Harms und Sauerbeck, 1983, 1984). Die Aufnahme und Verteilung von PAHs durch Pflanzen war von der Molekülgröße abhängig.

Verbindung	Fraktion	%
Benzo(a)pyren 	Sproß 50,6 mg TS/Pflanze	0,1
	Wurzel 13,0 mg TS/Pflanze	5,8
Dibenz(a,h)anthracen 	Sproß 59,8 mg TS/Pflanze	0,1
	Wurzel 17,8 mg TS/Pflanze	3,9
Benzantracen 	Sproß 53,6 mg TS/Pflanze	0,2
	Wurzel 15,9 mg TS/Pflanze	8,2
Anthracen 	Sproß 60,8 mg TS/Pflanze	1,3
	Wurzel 12,5 mg TS/Pflanze	13,2

TS = Trockensubstanz

Abbildung 8:

Radioaktivitätsverteilung (%) in Weizenpflanzen nach Behandlung mit ^{14}C -markierten PAHs

Höher kondensierte Ringsysteme wie Benzo(a)pyren und Dibenz(a,h)anthracen wurden nur in sehr geringem Maße aufgenommen und in der Pflanze transportiert. Mit abnehmender Molekülgröße - Benzanthracen, Anthracen - erhöhte sich der Anteil an Radioaktivität aus den ^{14}C -markierten Verbindungen in den oberirdischen Organen. Aus den vorgehenden Untersuchungen (Harms et al., 1977) ging hervor, daß z. B. Benzo(a)pyren im pflanzlichen Stoffwechsel metabolisiert und teilweise in oxydierte Derivate überführt wurde. Im Gegensatz zu Benzo(a)pyren selbst sind diese Metabolite besser wasserlöslich und werden daher auch innerhalb der Pflanze leichter verlagert. Nach neueren Erkenntnissen sind diese oxygenierten Derivate der PAHs potentere Karzinogene als die Ausgangsverbindungen selbst. Um neben der Molekülgröße auch den Einfluß der Molekülgestalt auf die Aufnahme und den Abbau zu verfolgen, wurden drei verschieden kondensierte Fünfringsysteme - Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)anthracen und Perylen - pflanzlichen Zellkulturen appliziert. Die Abbildung 9 faßt die Ergebnisse zusammen.

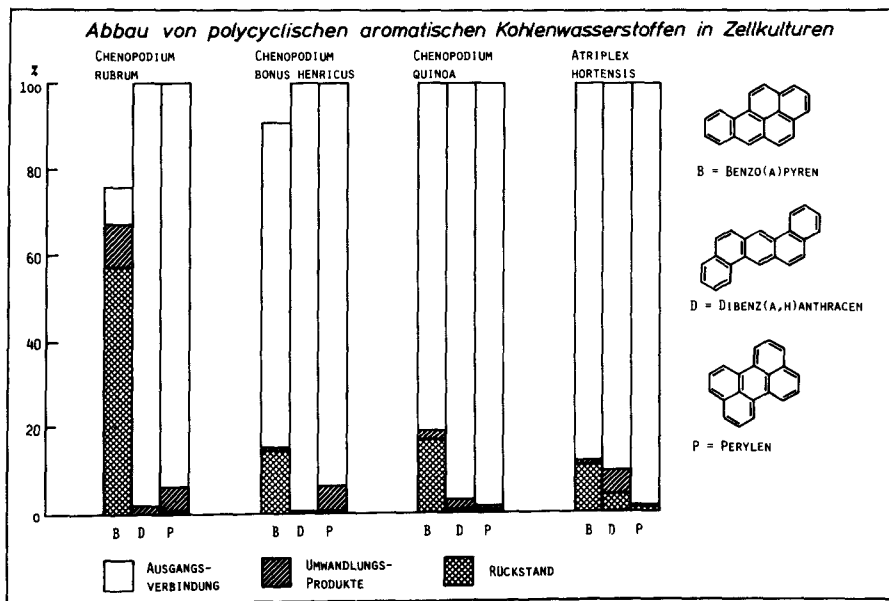


Abbildung 9:

Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Zellkulturen

Die Verbindungen Benzo(a)pyren und Perylen wurden insbesondere von Chenopodium rubrum-Kulturen umgewandelt, während Dibenz(a,h)anthracen von Atriplex hortensis-Zellen abgebaut wurde. Von Benzo(a)pyren wurden in großem Umfang (57 % der applizierten Radioaktivität nach 48 h Inkubation) nicht extrahierbare, teilweise proteingebundene Metabolite gebildet. Als isolierbare Verbindungen wurden Benzo(a)pyren 3,6 und -1,6-chinon identifiziert, die im Verlauf der Inkubation noch weitergehenden Umwandlungen unterlagen (Harms et al., 1977; Sandermann et al., 1983). Dibenz(a,h)anthracen erwies sich von den drei Fünfring-Systemen als die stabilste Konfiguration.

Aus vergleichenden Untersuchungen (Harms, 1981) mit intakten Pflanzen und Zellsuspensionskulturen ging hervor, daß die in beiden Systemen isolierten Metabolite qualitativ gleich waren. Die Zellkulturen inkorporierten in kürzerer Zeit aber wesentlich mehr von den applizierten Verbindungen, so daß entsprechend höhere Mengen an Metaboliten gefunden wurden.

Weiterhin wurden Perylen und Benzo(a)pyren nach der Standard-Testmethode (1 mg/l Substrat, 48 h Inkubation) Weizen- und Soja-Zellkulturen appliziert. Weizen-Zellkulturen zeigten bei beiden Verbindungen eine höhere Aufnahme, Sojazellen bildeten sowohl qualitativ als auch quantitativ mehr Metabolite, die hauptsächlich als polare Verbindungen im Nährmedium nachzuweisen waren.

4. Schlußfolgerungen aus den Untersuchungen

Pflanzliche Zellsuspensionskulturen wurden als Modellsystem für Stoffwechseluntersuchungen exogen applizierter Chemikalien verwendet. Durch Ringversuche in drei Laboratorien konnte die Anwendbarkeit dieses Testsystems gezeigt werden (Scheel et al., 1984; Ebing et al., 1984). Bei der Standardisierung von Metabolismusstudien ist besonders auf das Alter der Kulturen zu achten. Bei Pentachlorphenol konnte z. B. nachgewiesen werden, daß sowohl die Umwandlung in lösliche Konjugate als auch die Festlegung von Radioaktivität in nichtextrahierbare Rückstände während der linearen Wachstumsphase der Zellen relativ gleichbleibend ist, während beim Übergang zur stationären Phase die Bildung von Konjugaten innerhalb von 2 Tagen von 75 auf 20 % sinkt. Für vergleichende Untersuchungen sind daher Kulturen gleichen physiologischen Zustands notwendig.

Die wesentlichen enzymatischen Reaktionen bei den sehr unterschiedlichen Testchemikalien waren Konjugationsreaktionen mit Zuckern und Aminosäuren. Die nachfolgende Tabelle 2 faßt die Ergebnisse zusammen.

Bei allen Verbindungen und Kulturen traten nicht-extrahierbare Rückstände auf, die besonders bei Weizen-Zellkulturen und -pflanzen hohe Prozentanteile ausmachten. Eine Korrelation zwischen dem n-Oktanol/Wasser-Koeffizienten einer jeweiligen Referenzchemikalie und der Menge an umgewandelter Substanz konnte nicht gefunden werden.

Aus den vergleichenden Untersuchungen mit intakten Pflanzen und Zellkulturen ging hervor, daß die in beiden Systemen isolierten Verbindungen qualitativ gleich sind, eine Überprüfung ist aber für jede Chemikalie(ngruppe) notwendig.

Tabelle 2: Metabolismus verschiedener unter Standard-Testbedingungen
geprüfter Chemikalien

Chemikalie	% der applizierten Radioaktivität in Sojabohne		% der applizierten Radioaktivität in Weizen	
	lösli. Metabolite	unlösli. Rückstand	lösli. Metabolite	unlösli. Rückstand
Harnstoff	2,6	0,1	85,5	0,4
2,4-D	n.b.	2,8	n.b.	9,6
DEHP	20,1	0,6	24,7	7,7
PCP	60,1	7,1	56,2	38,6
Perylen	52,8	8,5	5,9	3,0
Benzo(a)pyren	47,2	15,6	28,5	9,0

n.b. = nicht bestimmt

Die Zellkulturen inkorporierten in kürzerer Zeit wesentlich mehr von den applizierten Verbindungen und bildeten entsprechend größere Mengen an Metaboliten, so daß die Identifizierung dieser Umwandlungsprodukte wesentlich einfacher war. Zellkulturen sind daher ein gutes Testsystem, um das stoffwechselphysiologische Verhalten von chemischen Verbindung zu verfolgen.

Literatur

- Bligh, E. G. and Dyer, W. J.: A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* 37, 911 - 917 (1959).
- Dougall, D. K.: The use of tissue cultures in studies of metabolism. In: Tolbert (ed.) *The biochemistry of plants*. Vol. 2, 627 - 642 (1980).
- Ebing, W., Haque, A., Schuphan, I., Harms, H., Langebartels, C., Sandermann, H., Scheel, D., von der Trenck, K. T.: Ecochemical assessment of environmental chemicals. Part 3: Draft guideline of the test procedure to evaluate metabolism and degradation of chemicals by plant cell cultures. *Chemosphere* (1984, in press).
- Harms, H.: Pflanzliche Zellsuspensionskulturen - ihr Leistungsvermögen für Stoffwechseluntersuchungen. *Landbauforsch. Völkenrode* 23, 127 - 132 (1973).
- Harms, H.: Metabolisierung von Benzo(a)pyren in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen. *Landbauforsch. Völkenrode* 25, 83 - 90 (1975).
- Harms, H., Dehnen, W. and Mönch, W.: Benzo(a)pyren metabolites formed by plant cells. *Z. Naturforsch.* 32 c, 321 - 326 (1977).
- Harms, H.: Aufnahme und Metabolismus polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PCKs) in aseptisch kultivierten Nahrungspflanzen und Zellsuspensionskulturen. *Landbauforsch. Völkenrode* 31, 1 - 6 (1981).
- Harms, H.: Uptake and conversion of three different 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in cell suspension cultures of various Chenopodiaceae-species. *Z. Naturforsch.* 38 c, 382 - 386 (1983).
- Harms, H. and Sauerbeck, D.: Toxic organic compounds in town waste materials: their origin, concentration and turnover in waste composts, soils and plants. In: Davis, R. D. and Hucker, G. (eds.) *Environmental effects of*

- organic and inorganic contaminants in sewage sludge. D. Reidel Comp., Dordrecht, Boston, London, 38 - 51 (1983).
- Harms, H. und Sauerbeck, D.: Organische Schadstoffe in Siedlungsabfällen: Herkunft, Gehalt und Umsetzung in Böden und Pflanzen. Angew. Botanik (in press).
- Krell, H. W. and Sandermann, H.: Plant biochemistry of xenobiotics. Bis-(2-ethylhexyl)-phthalate esterase. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1165 - 1166 (1983).
- Langebartels, C. and Harms, H.: Metabolism of pentachlorophenol in cell suspension cultures of soybean and wheat: pentachlorophenol glucoside formation. Z. Pflanzenphysiol. 113, 201 - 211 (1984 a).
- Langebartels, C. und Harms, H.: Metabolismus von Pentachlorphenol in Zellkulturen und Pflanzen. Verhandl. Ges. f. Ökologie (1984 b, in press).
- Mumma, R. O. and Davidonis, G. H.: Plant tissue culture and pesticide metabolism. In: Hutson, D. H. and Roberts, T. R. (eds.) Progress in Pesticide Biochemistry 3, 255 - 278 (1983).
- Rao, K. R. (ed.): Pentachlorophenol. Plenum Press, New York (1978).
- Sandermann, H., Diesperger, H. and Scheel, D.: Metabolism of xenobiotics by plant cell cultures. In: Barz, W., Reinhard, E. and Zenk, M. H. (eds.) Plant Tissue Culture and its Bio-technological Application. Springer-Verlag, Berlin, pp. 178 - 196 (1977).
- Sandermann, H., Scheel, D. and v. d. Trenck, T.: Metabolism of environmental chemicals by plants - copolymerization into lignin. J. Appl. Polymer Sci. 37, 407 - 420 (1983).
- Scheel, D., v. d. Trenck, K. T., Sandermann, H., Langebartels, C., Harms, H., Haque, A., Schuphan, I. und Ebing, W.: Gemeinsame Ringuntersuchungen für den Schnelltest zur Ermittlung der Metabolismusleistung von pflanzlichen Zellkulturen gegenüber organischen Chemikalien. In: Führ, F. et al. (eds.) Spezielle Berichte der KFA Jülich, Nr. 3 (1984, in press).
- Weiss, U. M., Moza, P., Scheunert, I., Haque, A. and Korte, F.: Fate of pentachlorophenol-¹⁴C in rice plants under controlled conditions. J. Agric. Food Chem. 30, 1186 - 1190 (1982).

Bundesminister für Forschung und Technologie
Forschungsbericht (03 7270)

UMWELTCHEMIKALIEN. IN PFLANZEN -
Untersuchung von Aufnahme und Abbau in
pflanzlichen Zellkulturen.

von

Heinrich Sandermann
Institut für Biologie II
der Universität Freiburg
D-7800 Freiburg i.Br.

Juni 1984

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Eine schnelle und standardisierte Version der früheren Metabolismus-Methodik für Zellsuspensionskulturen von Soja und Weizen wurde erarbeitet und mit folgenden Stoffen geprüft : 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure, 2,4,5-Trichlorophenoxyessigsäure, DDT, DDE, DDA, Hexachlorbenzol, Pentachlorphenol, Benzo[α]pyren und Bis-(2-äthylhexyl)-phthalat.
2. Die relativen Standardabweichungen wurden unabhängig von der Polarität der Chemikalie zu $\pm 10-20\%$ bestimmt. In Ringtestversuchen lagen die relativen Interlaboratoriums-Abweichungen bei $< 25\%$.
3. Bei den polareren Testchemikalien waren die Metabolite qualitativ dieselben wie in Ganzpflanzenversuchen. Die Zellkulturen konnten jedoch auch Chemikalien umsetzen, die in intakten Pflanzen als schwer abbaubar und als ubiquitäre Verunreinigungen bekannt sind. Dies wurde am Beispiel Bis-(2-äthylhexyl)phthalat auf eine "Kryptizität" der Abbauenzyme zurückgeführt.
4. Neben etlichen neuen Einzelreaktionen wurden zwei neue Zweischritt-Wege nachgewiesen. Pentachlorphenol wurde in das β -D-Glucosid und dieses in das (O-Malonyl)- β -D-Glucosid umgewandelt. DDT wurde zu DDA und dieses zu Hexose-Estern umgesetzt.
5. Im Fall der von der 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure abgeleiteten β -D-Glucoside wurde eine spezifische Ablagerung in der Vakuole der Sojazellen nachgewiesen.
6. Mit einem neuen Gelpermeationsverfahren wurde im Fall der 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und bei Pentachlorphenol ein kovalenter Einbau in das Lignin der Zellen nachgewiesen.

SUMMARY.

1. A rapid standardized version of previous cell culture techniques was worked out and used to study the metabolism of the following chemicals by soybean and wheat cells, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, DDT, DDE, DDA, hexachlorobenzene, pentachlorophenol, benzo[α]pyrene and bis-(2-ethylhexyl)-phthalate.
2. Relative standard deviation of $\pm 10-20\%$ were determined, independent of the polarity of the test chemical. In ringtest experiments the relative interlaboratory deviations were $< 25\%$.
3. The metabolites of the more polar chemicals were qualitatively the same as in intact plants. However, the cultured cells were also able to metabolize nonpolar chemicals which are known as non-degraded ubiquitous contaminants of intact plants. With bis-(2-ethylhexyl)-phthalate as example, the discrepancy was explained by "crypticity" of the metabolic enzymes in the intact plant.
4. Besides a number of individual novel metabolic reactions, two two-step reactions were found. These were i) the transformation of pentachlorophenol to β -D-glucosyl and (O-malonyl)- β -D-glucosyl conjugates, and ii) the conversion of DDT to DDA, and of DDA to DDA-hexose esters.
5. A specific deposition in the cellular vacuole was demonstrated for the β -D-glucosides derived from 2,4-D.
6. In the cases of 2,4-D and pentachlorophenol a covalent incorporation into lignin could be demonstrated with the help of a newly developed gel permeation procedure.

ERGEBNISSE.

Der vorliegende Bericht ist relativ knapp gehalten, da alle wesentlichen Ergebnisse veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht sind. Im folgenden sollen die einzelnen Punkte der Zusammenfassung mit Angabe der Veröffentlichungen durchgegangen werden.

Zu Punkt 1. Das jetzt "Ringtestprozedur" genannte, standardisierte Verfahren lehnt sich eng an unsere Vorarbeiten der Jahre 1976/1977 an [1-3]. Der jetzige Stand der Zellkulturtechnik und der erhaltenen Metabolismusergebnisse ist in einem Übersichtsartikel [4] beschrieben. Detaillierte Einzelartikel galten dem Stoffwechsel von Benzo[α]pyren [3,5], 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure [6,7], Pentachlorphenol [4,8-11], sowie DDT, DDE und DDA [1,4,12]. Weniger detailliert waren die Arbeiten über die 2,4,5-Trichlorophenoxyessigsäure [4], das Hexachlorbenzol [4] und das Bis-(2-Äthylhexyl)-phthalat [4,12].

In einigen Übersichtsartikeln wurden die eigenen Ergebnisse im Zusammenhang dargestellt [2,4,8,11,13,14].

Zu Punkt 2. Relative Abweichungen von + 10-20% wurden zunächst bei der Untersuchung des 2,4-D Stoffwechsels mit einer Äthanol-Extraktionsprozedur in Soja und Weizen gefunden [6]. Derselbe Bereich trat dann für relative Standardabweichungen der folgenden, mit einer Chloroform/Methanol-Extraktionsprozedur durchgeführte Experimente auf ; bei Pentachlorphenol [4,9], bei DDT [4,15], bei DDE und DDA [15], sowie bei Hexachlorbenzol, 2,4,5-Trichlorophenoxyessigsäure und Bis-(2-Äthylhexyl)-phthalat [4]. Die Ringtestversuche mit Interlaboratoriumsabweichungen von $\leq 25\%$ werden in diesem Berichtsband in einem gemeinsamen Bericht beschrieben [16].

Zu Punkt 3. Im Fall von 2,4-D stimmte das Überwiegen von Aminosäure-Konjugaten bei Soja und von Glucosid-Konjugaten bei Weizen gut mit dem bekannten Metabolitmuster von zwei- bzw. einkeimblättrigen ganzen Pflanzen überein [6]. Auch bei dem Metabolismuster von Pentachlorphenol ergaben sich Ähnlichkeiten zwischen Zellkulturen und ganzen Pflanzen [4,9]. Bei den persistenten Stoffen (DDT, DDE, Hexachlorbenzol, Benzo[α]pyren und Bis-(2-Äthylhexyl)-phthalat) wurde jedoch in den Zellkulturen teilweise hoher Metabolismus festgestellt. Diese Stoffe gelten in ganzen Pflanzen als kaum abbaubar und sie wurden weltweit als pflanzliche Verunreinigungen nachgewiesen. Im Fall von Bis-(2-Äthylhexyl)-Phthalat konnten wir das erste Stoffwechselenzym - ein bestimmtes von mehr als 12 Esterase-Isoenzymen des Weizens - isolieren und zur Homogenität reinigen [17,18]. Dieses Enzym wurde auch in intakten Weizenpflanzen nachgewiesen [18,19], obwohl über 15 Tage hinweg keinerlei Abbau von Bis-(2-Äthylhexyl)-Phthalat mit den ganzen Pflanzen erzielt werden konnte. Die Chemikalie reicherte sich vielmehr in der Kutikula an [19]. Wir erklären den Widerspruch zwischen Abbau in der Zellkultur und Persistenz in der intakten Pflanze mit dem in den 60er Jahren in der Mikrobiologie etablierten Konzept der "Kryptizität". Enzyme für

persistente Chemikalien existieren auch in intakten Pflanzen, sie sind jedoch auf Grund von Transportschranken (Verteilung in Kutikula oder Oleosomen, Adsorption an Zellwände) nicht zugänglich [19].

Zu Punkt 4. Folgende, zum großen Teil zuvor nicht beschriebene Metabolite wurden isoliert und durch TLC, HPLC, GC und MS charakterisiert :

Bei 2,4-D [6]; Aminosäure-Konjugate des 2,4-D, β -D-Glucoside des 4-OH, 2,5-D und 4-OH, 2,3-D, ein definiertes kovalent modifiziertes Protein und Lignin (s.u.).

Bei 2,4,5-T [4]; Aminosäure-Konjugate des 2,4,5-T, eine Hydroxy-Verbindung (OH-Gruppe jedoch nicht lokalisiert).

Bei Benzo[α]pyren [3,5]; das 3,6-Chinon, Lignin als wahrscheinliche Komponente im "unlöslichen Rückstand".

Bei Pentachlorphenol [8-11]; Lignin als "unlöslicher Metabolit, ein Zweischnitt-Stoffwechsel über das β -D-Glucosid von PCP zum (O-Malonyl)- β -D-Glucosid.

Bei DDT [1,15]; DDE als unpolarer Metabolit. Zweischnittstoffwechsel über DDA zu Hexose-Estern des DDA.

Zu Punkt 5. Es konnte erstmals durch eine direkte Zellfraktionierung die oft vermutete Ablagerung von Pestizid-Konjugaten in der pflanzlichen Vakuole nachgewiesen werden. Dies gelang für die vom 2,4-D abgeleiteten β -D-Glucoside in Soja-Zellkulturen [20].

Zu Punkt 6. Durch ein spezifisches sequentielles Extraktionsverfahren und vor allem durch ein neuentwickeltes Gelpermeationsverfahren für Lignine [21] konnte erstmals schlüssig der kovalente Einbau von Pestizid-Derivaten in die Ligninkomponente "unlöslicher" Rückstände nachgewiesen werden. Dies gelang für 2,4-D [7] und für Pentachlorphenol [8,9] in Soja- und in Weizenzellen. In Weiterführung vorheriger ^1H - und ^{13}C -NMR Untersuchungen an Chloranilin/Lignin-Copolymeren [22] konnte der Pentachlorphenol/Lignin-Metabolit aus Weizenzellen durch ein ^{13}C -NMR Spektrum charakterisiert werden [9].

DISKUSSION.

Die erhaltenen Ergebnisse führten zu folgenden Schlußfolgerungen [4],

1. Die Zellkulturtechnik erlaubt, den Metabolismus von polaren wie unpolaren Chemikalien in ca. 1 Woche Arbeitszeit (+ Inkubationszeit) zu bestimmen. Die Standardabweichung dabei liegt bei ± 10 -20%.
2. Bei relativ polaren Chemikalien sind die Ergebnisse in der Zellkultur qualitativ und semi-quantitativ mit den an intakten Pflanzen gewonnenen Ergebnissen vergleichbar.
3. Bei unpolaren Chemikalien, die in intakten Pflanzen kaum umgesetzt werden, kommt es in Zellkulturen trotzdem zu teilweise hohen Umsatzraten. Daher werden Zellkulturen wahrscheinlich kein zuverlässiges "Ranking" über einen breiten Polaritätsbereich erlauben.
4. Die Haupteignung der Zellkulturen scheint bei vorläufigen Abbautests und vor allem in der biotechnischen Herstellung von Metaboliten zu liegen. Häufig kann die Stoffwechselleistung

durch Induktion oder andere Manipulationen erheblich gesteigert werden. Dies erleichtert die Isolierung der Stoffwechselenzyme, erlaubt jedoch vor allem, größere Mengen pflanzlicher Metabolite für Bioverfügbarkeits- und Toxizitätsbestimmungen im Tier herzustellen.

ZITIERTE LITERATUR.

- [1] D.Scheel und H.Sander mann (1977) Metabolism of DDT and Kelthane in Cell Suspension Cultures of Parsley (Petroselinum hortense, Hoffm.) and Soybean (Glycine max L.), Planta 133, 315 - 320.
- [2] H.Sander mann, H.Diesperger und D.Scheel (1977) Metabolism of Xenobiotics by Plant Cell Cultures. In, Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application (W.Barz, E.Reinhard und M.H.Zenk, hrg.), pp. 178 - 196, Springer-Verlag, Berlin.
- [3] K.T.v.d.Trenck und H.Sander mann (1978) Metabolism of Benzo[α]pyrene in Cell Suspension Cultures of Parsley (Petroselinum hortense, Hoffm.) and Soybean (Glycine max L.), Planta 141, 245 - 251.
- [4] H.Sander mann, D.Scheel und Th.v.d.Trenck (1984) Use of Plant Cell Cultures to Study the Metabolism of Environmental Chemicals. Ecotoxicol. Environ. Safety 8, 167 - 182.
- [5] Th.v.d.Trenck und H.Sander mann (1981) Incorporation of Benzo[α]pyrene Quinones into Lignin. FEBS Letters 125, 72 - 76.
- [6] D.Scheel und H.Sander mann (1981) Metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Cell Suspension Cultures of Soybean (Glycine max L.) and Wheat (Triticum aestivum L.), I. General Results. Planta 152, 248 - 252.
- [7] D.Scheel und H.Sander mann (1981) Metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Cell Suspension Cultures of Soybean (Glycine max L.) and Wheat (Triticum aestivum L.), II. Evidence for Incorporation into Lignin. Planta 152, 253 - 258.
- [8] H.Sander mann, D.Scheel und T.v.d.Trenck (1983) Metabolism of Environmental Chemicals by Plants - Copolymerization into Lignin. J. Applied Polymer Science, Applied Polymer Symposium 37, 407 - 420.
- [9] D.Scheel, W.Schäfer und H.Sander mann (1984) Metabolism of Pentachlorophenol in Cell Suspension Cultures of Soybean (Glycine max L.) and Wheat (Triticum aestivum L.). General Results and Isolation of Lignin Metabolites. J. Agric. Food Chem., eingereicht.
- [10] R.Schmitt, J.Kaul, T.v.d.Trenck, E.Schaller und H.Sander mann (1984) β -D-Glucosyl and O-Malonyl- β -D-Glucosyl Conjugates of Pentachlorophenol in Soybean and Wheat. Identification and Enzymatic Synthesis. Manuskript in Vorbereitung.
- [11] H.Sander mann (1984) Herbicide Resistance through Gene Transfer ? Biochemical and Toxicological Aspects. In, The Impact of Gene Transfer Techniques in Eucaryotic Cell Biology (J. Schell und P.Starlinger, hrg.), Springer-Verlag, Berlin, im Druck.

- [12] D.Scheel und H.Sandermann (1981) Metabolism of Persistent Environmental Chemicals in Plants. Di-Ethylhexyl-Phthalate. *Regard sur la Biochimie* 3, 104 (Abstract No. W.4.39).
- [13] H.Sandermann (1982) Metabolism of Environmental Chemicals. A Comparison of Plant and Liver Enzyme Systems. In, *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology* (E.J. Klekowski, hrg.), Vol. 1, pp. 1 - 32, Praeger Scientific, New York.
- [14] H.Sandermann (1984) Umweltchemikalien in Pflanzen. *Umschau* 1984 (4), 115 - 118.
- [15] M.Arjmand und H.Sandermann (1984) Metabolism of DDT and Related Compounds in Cell Suspension Cultures of Soybean (*Glycine max* L.) and Wheat (*Triticum aestivum* L.), Manuskript in Vorbereitung.
- [16] D.Scheel, K.T.v.d.Trenck, H.Sandermann, C.Langebartels, H.Harms, I.Schuphan, A.Hague und W.Ebing (1984) Gemeinsame Ringuntersuchungen für den Schnelltest zur Ermittlung von Metabolismusleistung von pflanzlichen Zellkulturen gegenüber organischen Chemikalien, dieser Band, pp. - .
- [17] H.W.Krell und H.Sandermann (1983) Plant Biochemistry of Xenobiotics. Bis-(2-ethylhexyl)-phthalate Esterase. Hoppe-Seyler's *Z.Physiol.Chem.* 364, 1165 - 1166 (Abstract).
- [18] H.W.Krell und H.Sandermann (1984) Plant Biochemistry of Xenobiotics. Purification and Properties of a Wheat Esterase Hydrolyzing the Plasticizer Chemical, Bis-(2-ethylhexyl)-phthalate. *Eur.J.Biochem.*, im Druck.
- [19] H.W.Krell und H.Sandermann (1984) Crypticity. A Possible Explanation for the Persistence of Certain Environmental Chemicals in Plants. Abstracts Book, International Symposium "Bioavailability of Environmental Chemicals", 12-14.9.1984, Schmallingenberg, im Druck.
- [20] R.Schmitt und H.Sandermann (1982) Specific Localization of β -D-Glucoside Conjugates of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Soybean Vacuoles. *Z.Naturforsch.* 37c, 772 - 777.
- [21] T.v.d.Trenck, D.Scheel und H.Sandermann (1979) Detoxification of Environmental Chemicals by Copolymerization into Lignin. Hoppe-Seyler's *Z.Physiol.Chem.* 360, 1199 (Abstract).
- [22] K.T.v.d.Trenck, D.Hunkler und H.Sandermann (1981) Incorporation of Chlorinated Anilines into Lignin. *Z-Naturforsch.* 36c, 714 - 720.

Bundesminister für Forschung und Technologie
Forschungsbericht (0372720)

Schnellverfahren zur Beurteilung des Abbaus
von Wirkstoffen durch standardisierte
pflanzliche Zellkulturen

von

I. Schuphan, A. Haque und W. Ebing

Institut für Pflanzenschutzmittelforschung

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Berlin

Institutsleiter:

Dir. u. Prof. Dr. W. Ebing

Mai 1983

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Für die ökotoxikologische Prüfung von Chemikalien wird die ökologisch und ökonomisch wichtige Kenntnis des zu erwartenden Umwandlungs- und Abbauverhaltens von Chemikalien in pflanzlichen Geweben benötigt. Die Ermittlung dieser Veränderbarkeit bis hin zum vollständigen Abbau - der letztendlichen Mineralisierung - von Chemikalien in pflanzlichen Systemen in Abhängigkeit von der Struktur der Wirkstoffe ist deshalb von großer Bedeutung, weil die betroffene Pflanze durch ihre physiologische Tätigkeit als Eliminierfaktor (Senke) von organischen Chemikalien aus der Umwelt fungieren kann. Tritt auf Grund der besonderen Struktur mancher Chemikalien dieser Abbaumechanismus in Pflanzen nicht in Kraft, dann besteht die Möglichkeit einer Schädigung der Pflanze durch akkumulierende Stoffe mit allen Konsequenzen für das Ökosystemgefüge, mit der Folge einer Gefährdung des Menschen infolge des Verzehrs des kontaminierten Pflanzenmaterials.

Bisher entwickelte Testsysteme zur Beurteilung des angesprochenen Umwandlungs- und Abbauverhaltens benutzen das komplexe System Boden-Pflanze. Nach Applikation der zu testenden Umweltchemikalie kann dabei aber nicht unterschieden werden, welche *A n t e i l e* des Wirkstoffes durch andere Faktoren, z.B. die Bodenmikroorganismen, verändert und dann als Umwandlungsprodukte von der Pflanzenwurzel aufgenommen, also gar nicht aktiv von der Pflanze verstoffwechselt wurden.

Ein einfaches, im Rahmen der Projektförderung zu entwickelndes System sollte dagegen die kurzfristige Beurteilung der Abbaubarkeit von Umweltchemikalien durch Pflanzenzellkulturen, unbeeinflusst durch störende Seiteneffekte, ermöglichen. Bei der Entwicklung eines in vitro-Testes sollte die einfache Durchführbarkeit gepaart mit verlässlicher Reproduzierbarkeit im Vordergrund stehen. Dadurch könnte zukünftig eine Vielzahl von Testchemikalien in diesem System geprüft werden. Anhand der erhaltenen Daten sollte eine Reihung der getesteten Substanzen nach steigender Metabolisierbarkeit relativ zu einander möglich sein. Diese Daten wären in ein Raster von Ergebnissen aus anderen Umwelt-Verträglichkeitstests einzuordnen. Diese Verknüpfung der Daten ließe Schlüsse auf das wahrscheinliche Ver-

halten der Testsubstanz zu, was wiederum bei Vorbehalten den gezielten Einsatz ausgewählter, z.B. naturnaher Testmethoden zur konkreten Umweltverträglichkeitsprüfung im Einzelfall ermöglichen würde.

Um die Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit der Ergebnisse aus dem zu entwickelnden Test zu sichern, sollte dieser in Form eines Ringtests überprüft werden (siehe nachfolgender Bericht) und Niederschlag in einer zu empfehlenden Richtlinie finden (siehe Anhang I). Insbesondere unterrichtet Abb. 1 des nachfolgenden Berichts in Kurzform über den Testablauf.

2. Material und Methoden

Die Zucht der Soja- und Weizenzell-Suspensionskulturen sowie alle technischen Einzelheiten zur Ausführung des Schnelltests (zur Beurteilung des Metabolismus- und Abbauverhaltens von Chemikalien durch standardisierte Gewebekulturen) sind in dem Anhang I beschrieben.

3. Ergebnis des Forschungsauftrags

Es wurde ein pflanzlicher in vitro-Test unter Verwendung von sterilen Soja- und Weizenzellsuspensionskulturen entwickelt. Er gestattet nach Einsatz von zu prüfenden Chemikalien die Bestimmung von Metabolitenfraktionen. Die Ergebnisse schlagen sich nieder in der Erfassung des Anteils weniger polarer*, polarer Metaboliten* und nicht extrahierbarer Rückstände* in Prozent der ursprünglich im Versuch eingesetzten Testchemikalien-Menge, der Umsatzrate*. Daneben werden Daten über die Verteilung der Prüfchemikalie zwischen Nährmedium und Pflanzenzellen erhalten, die Rückschlüsse auf das Vermögen der Chemikalie erlauben, die Zellwände zu durchdringen.

Die Testprozedur fand Niederschlag in einer ausführlichen Richtlinie (Anhang I).

4. Allgemeines zur Methodenentwicklung

Im Verlaufe der Entwicklung wurden mehrere Methodenvarianten

* Definitionen siehe unter 1.2 des Anhangs I

nebeneinander oder nacheinander erprobt*. Der Verlauf dieser Forschungsarbeiten soll nachfolgend skizziert werden:

Auf Grund der unterschiedlichen Zell-Wachstumszyklen (Soja 7, Weizen 14 Tage) wurde anfänglich unterschiedlich lange inkubiert. Die Zugabe der Prüfchemikalie erfolgte bei Soja am 5. Tag, bei Weizen am 10. Tag. Bei Weizen zeigte sich, daß eine Applikation am 12. Tag ebenfalls ausreichend ist, so daß für beide Kulturen einheitlich eine 48stündige Inkubation vorgenommen werden kann.

Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Nährmedium über eine Schlitzfilternutsche abgetrennt. Das Zellmaterial wurde anschließend in einem homogenen Gemisch aus Chloroform/Methanol/Wasser durch Ultrabeschallung aufgeschlossen. Danach erfolgte eine Trennung in die Chloroform- und in die Methanol/Wasser-Phase. Diese Trennung wurde später nicht mehr durchgeführt, wie unter 5.2 (Verbesserung der Arbeitsmethode) ausführlich dargestellt.

Die hier berichtende Arbeitsgruppe verwendete das erste Jahr ausschließlich 100 ml-Inkubationskolben (Weithals-Erlenmeyer-Kolben) mit 20 ml Nährmedium und 1 g Überimpfmaterial (Soja- und Weizenzellen). Für die Zwecke der Standardisierung bei den Ringuntersuchungen und Angleichung an die Möglichkeiten der Ringversuchspartner wurden zeitweise 100- und 200 ml Kolben (mit 40 ml Nährmedium und 2 g Inokulum) parallel nebeneinander verwendet. Die Vorteile der 100 ml-Variante werden unter 5.3 dargelegt.

Während der Einarbeitungszeit im ersten Jahr wurden anfänglich noch keine Differenzierungen von sowohl den Extrakten als auch den Nährmedien durchgeführt. Vielmehr wurde erst einmal versucht den Nachweis zu führen, daß bei der routinemäßigen Anwendung der Prozedur reproduzierbare Verteilungen der ^{14}C -Aktivitäten zwischen Nährmedium, Chloroform- und Methanol/Wasserextrakt sowie Zellrückstand auftreten. Erst nach positiver Bestätigung dieses Tatbestandes wurde eine dünnschichtchromatographische Differenzierung in einzelne Metabolitenfraktionen vorgenommen. Dadurch wurde es dann möglich, die Umsatzrate der Testsubstanz zu errechnen.

* An den Untersuchungen - insbesondere bei den Ringversuchen und einigen methodischen Weiterentwicklungen - beteiligten sich die Arbeitsgruppe C. Langebartels, H. Harms; FAL, Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Braunschweig-Völkenrode und die Arbeitsgruppe D. Scheel und H. Sandermann, Uni-Freiburg, Biologisches Institut II, Lehrstuhl für Biologie der Pflanzen, Freiburg.

5. Einzelergebnisse

5.1 Ergebnisse mit der Referenzchemikalie 2,4-D

Aus den Merkblättern über Referenzchemikalien von Battelle* wurde als erste Chemikalie die im Handel auch radioaktiv markiert leicht erhältliche $^{14}\text{C}_{(2)}$ -2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) in Weizen- und Sojazellkulturen eingesetzt (s. Abb.1).

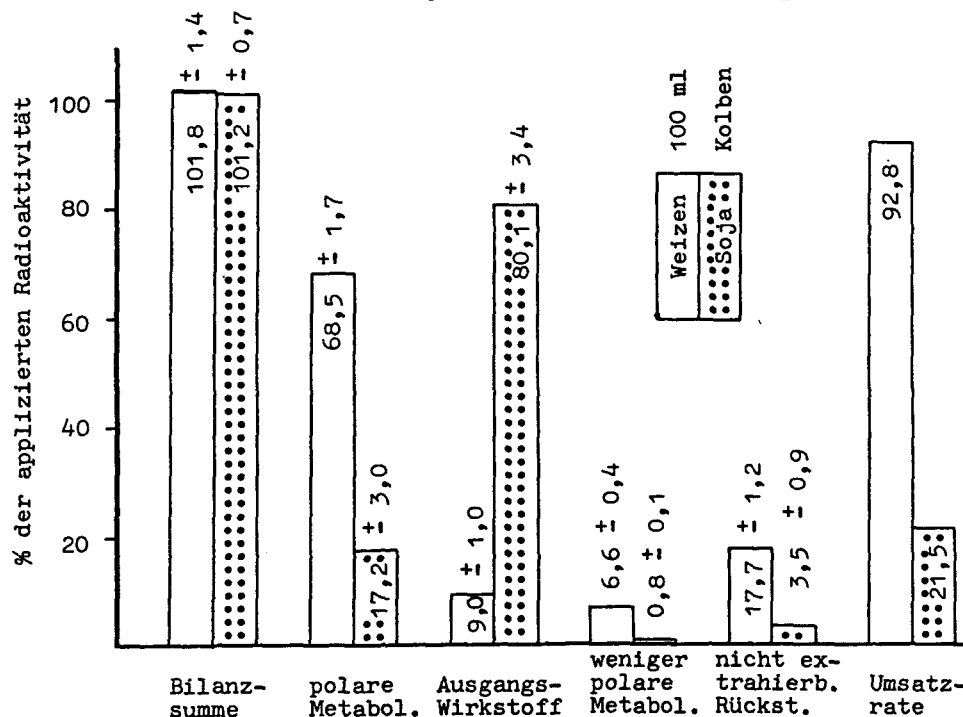


Abb. 1: Metabolisierungs- und Umsatzraten von ^{14}C -2,4-D (1 mg/l) in Weizen- und Sojazellkulturen. Mittelwerte aus je 12 Einzelmessungen \pm (Vertrauensbereich, in dem mit 95 % Wahrscheinlichkeit der Mittelwert liegt; s. Anhang I, Anlage 9).

Der große Unterschied zwischen den Umsatzraten in der Weizenzellkultur (92,8 %) und der Sojazellkultur (21,5 %) wurde nicht erwartet. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, daß sich die Weizen- und Sojazellen eventuell unterschiedlich stark an das im Nährmedium ständig als Wachstumsstoff zu 2 mg/l (Weizen) und 1 mg/l (Soja) vorhandene 2,4-D über die vieljährige Kulturzeit adaptiert hatten. Dies war der Grund, daß weitere Versuche zur Optimierung und Vereinfachung des Aufschluß-

* Merkblätter über Referenzchemikalien; Battelle Institut e.V., Frankfurt; im Auftrag der KFA Jülich, Projektträgerschaft Umweltchemikalien.

und Extraktionsverfahrens sowie der Konzentrierung von Nährmedium und Zellextrakten mit einer anderen Prüfchemikalie aus der Referenzliste erfolgen sollten.

5.2 Verbesserung der Arbeitsmethode mit PCP

Das in großem Umfang als Holzschutz - und in geringerem Maße auch als Herbizid (Entblätterungsmittel) - eingesetzte Pentachlorphenol (PCP) wurde radioaktiv ^{14}C -phenylmarkiert für weitere Versuche herangezogen. Es galt insbesondere zu klären, ob unterschiedliche Aufschluß- und Extraktionsverfahren der Zellen zu unterschiedlichen Endergebnissen führen. Die vergleichenden Untersuchungen zeigten, daß eine fünfminütige Ultrabeschallung direkt in dem 100 ml-Schraubdeckelglas, in dem die Zellen bei -18°C bis zur Aufarbeitung gelagert werden, ausreichend ist. Besonders hat sich die Micro Tip 6,5 des Ultraschall-Geräts Sonifier B 12 für diesen Zweck bewährt. Eine aufwendigere, mechanische Zerkleinerung brachte im Vergleich keine Vorteile. Auch verschiedene Nachwaschprozeduren, z.B. mit 1 %iger Natriumdodecylsulfat-Lösung oder der Ersatz des Wasseranteils im Bligh-Dyer-Extraktionsgemisch (s. Anhang I, 1.5, 1.4) durch $1,8 \times 10^{-2}$ molare Ammoniumacetat-Lösung, ergab keine wesentlich besseren Ausbeuten. Diese Versuche waren deshalb bedeutsam, weil beim Vergleich von Weizen und Soja die nicht extrahierbaren Rückstandswerte immer im Fall des Weizens stark erhöht waren. Es sollte sichergestellt werden, daß es sich hier wirklich um "gebundene Rückstände" und nicht um Radioaktivitäten handelt, die aufgrund schlechter Zerkleinerung und Extraktion unvollständig herausgelöst wurden. Die Wandungen der Weizenzellen sind nämlich im Vergleich zu Soja bedeutend dicker. Offenbar wird aber in die stärker ligninhaltigen Zellwände des Weizens chemische Fremdsubstanz in erhöhtem Maße eingebaut.

In weiteren Versuchen wurde ermittelt, daß eine üblicherweise nach der Bligh-Dyer-Extraktion vorgenommene Trennung der Zellextrakte in eine Chloroform- und eine Methanol-Wasserphase nicht sinnvoll ist. Da sich Ausgangstestchemikalie und gebildete Metaboliten im allgemeinen über beide Phasen verteilen, konnte vielmehr die dünnschichtchromatographische Differenzierung des Gesamtextraktes - anstelle der zweimaligen Dif-

ferenzierung der getrennten Phasen - eine w e s e n t l i -
c h e Arbeitersparnis und gleichzeitig auch eine Verringe-
rung der additiven Fehler erbringen.

Untersuchungen über die S c h w a n k u n g e n von Werten
verschiedener Ansätze, die zu unterschiedlichen Zeiten aufge-
arbeitet wurden, konnten Abhängigkeiten zwischen den verschie-
denen Arten der Konzentriertechniken sowie unterschiedlicher
Wiederaufnahme-Methoden aufdecken. Durch unvollständige Wie-
derauflösung der Einengrückstände entstehen dann Fehler bei
der anschließenden Differenzierung.

Die beste Möglichkeit zur Vermeidung von Verfälschungen der Ergeb-
nisse besteht darin, die Extrakte und das Nährmedium n i c h t
einzulegen, sondern als Originallösungen direkt auf die Dünn-
schichtplatten strichförmig (Strichlänge 15-20mm) aufzutragen.
Dafür hat sich in hervorragender Weise das automatisch arbei-
tende Auftragegerät Linomat III, Firma Camag, bewährt. Gesamtlö-
sungsmengen bis zu 1 ml pro 20 mm Auftragestrecke können pro-
blemlos aufgetragen werden und führen zu noch sehr scharfen Tren-
nungen. Die Zusammenstellung von drei ^{14}C -PCP-Serien (Abb. 2)

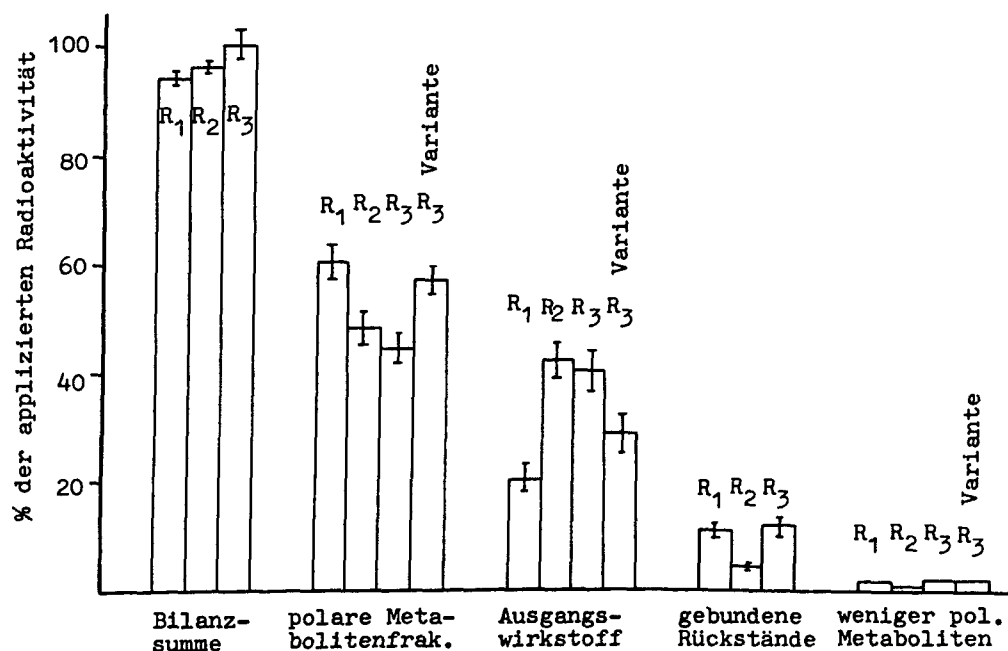


Abb. 2: Metabolisierung von ^{14}C -PCP (1 mg/l) in Soja-Kulturen
R₁ = Versuch im Rahmen der Ringtestserie 1981; R₂ des-
gleichen 1982; R₃ = Wiederholung des Versuchs R₂; R₃-
Variante = alle Extrakte o h n e v o r h e r f i g e
K o n z e n t r i e r u n g auf Dünnschichtplatte
aufgetragen.

enthält eine Variante R_3 , bei der der Extrakt und das Nährmedium der dritten Serie uneingeengt differenziert worden war. Der geringere polare Metabolitenanteil und damit höhere Anteil an Ausgangswirkstoff in R_3 verglichen mit R_3 -Variante ist darauf zurückzuführen, daß polare Metabolitenanteile, gebunden an sich absetzende und nicht wieder in Lösung gehende Feststoffe, nach einer Konzentrierung verloren gehen.

Zur schonungsvollen, wenig verlustreichen K o n z e n t r i e r u n g des Nährmediumextraktes hat sich auch eine Übergefrieretechnik im geschlossenen Vakuum (Abb. 3) bewährt. Aber

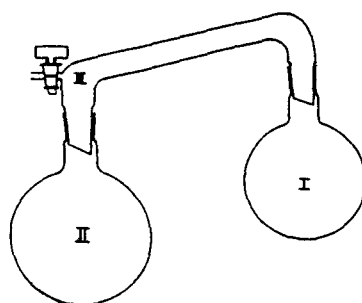


Abb. 3: Apparatur zur Gefriertrocknung im geschlossenen System
I Probenkolben mit eingefrorenem Trockengut (z.B. Nährmedium)
II Vorlagekolben gekühlt mit flüssigem Stickstoff
III Apparatur kurzzeitig evakuiert auf $< 0,1$ Torr.

auch bei dieser Technik besteht das Problem, anschließend den Extrakt-Rückstand in einem kleinen Lösungsmittelvolumen wieder in Lösung zu bringen. Am besten bewährt hat sich eine Lösungsmittelmischung aus Methanol/Chloroform (2:1) unter Anwendung von Ultrabeschallung.

5.3 Vergleichende Versuche mit 100 ml- und 200 ml-Kolben

Die in der Richtlinie beschriebene Methodik (Anhang I) zur Durchführung der Versuche mit Pflanzenzellsuspensionskulturen wurde aus Gründen der sparsamen Verwendung von Nährsubstanzen, Lösungsmitteln und teuren ^{14}C -markierten Prüfstoffen (einschließlich entstehender Abfallprobleme) auf der Basis von 100 ml-Ansätzen erstellt. Daß eine Reduzierung des Kulturkolben-Volumens von 200 ml mit je 40 ml Nährmedium (beide Ansatzgrößen sind gebräuchlich) auf 100 ml-Kolben mit nur je 20 ml Nährmedium keinen Einfluß auf die zu erwartenden Ergebnisse

hat, wurde mit folgenden Parallelserien erhärtet (Abb. 4).

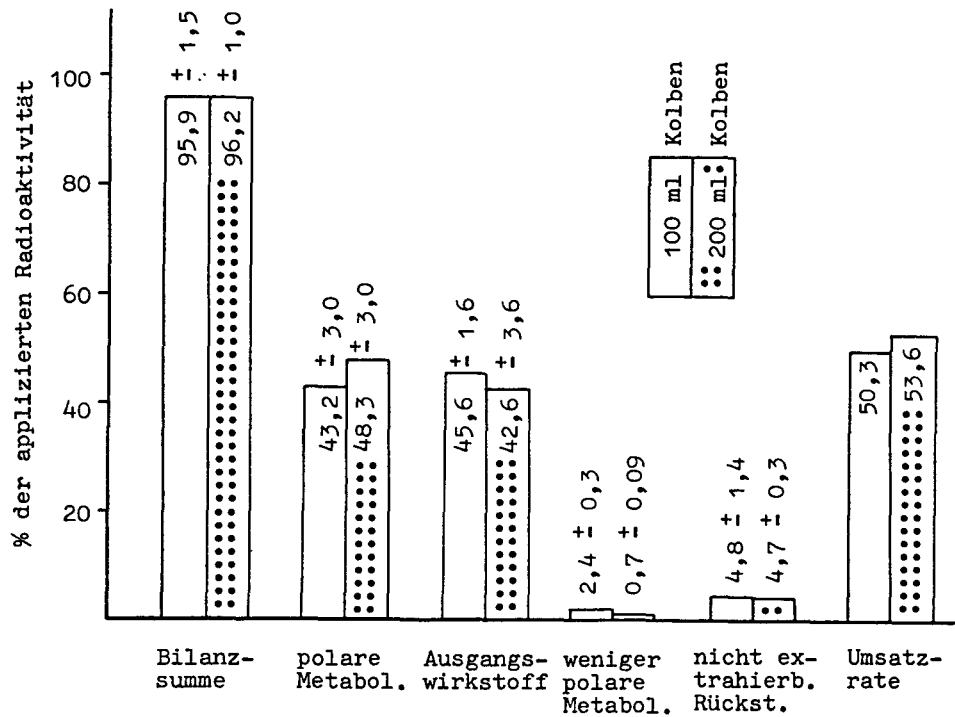


Abb. 4: Metabolisierung von ^{14}C -PCP (1 mg/l) in Soja-Zellkulturen im vergleichenden Test in 100 ml-Kulturkolben (20 ml Nährmedium) und in 200 ml-Kulturkolben (40 ml Nährmedium). Mittelwerte aus je 6 Wiederholungen.

Nicht nur die Metabolisierung konnte in den zwei verschiedenen Volumina als identisch nachgewiesen werden, sondern auch die gemessenen Wachstumsparameter (Abb. 5)*.

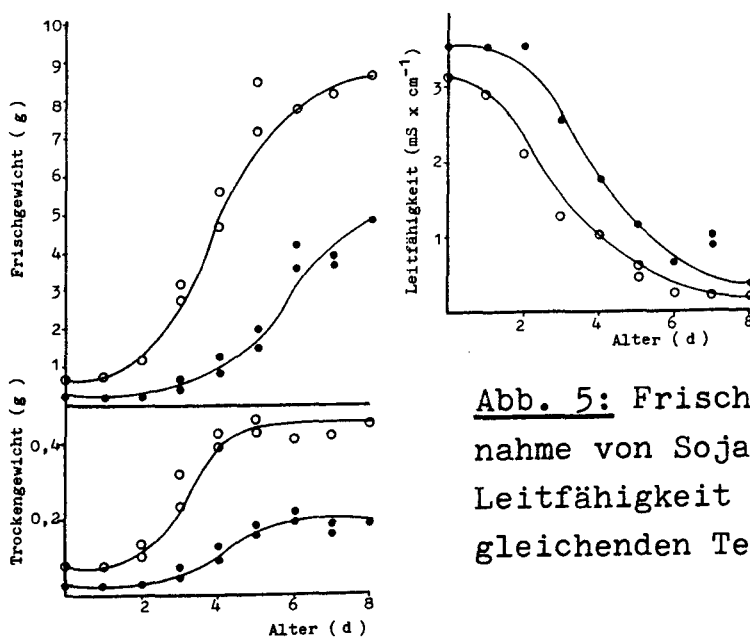


Abb. 5: Frisch- und Trockengewichtszunahme von Soja-Zellen und Abnahme der Leitfähigkeit des Nährmediums im vergleichenden Test*.

- 100 ml-Kulturkolben
20 ml Nährmedium
- 200 ml-Kulturkolben
40 ml Nährmedium

* s. Fußnote auf der folgenden Seite.

Die Verwendung kleiner Versuchskolben bringt auch große Vorteile durch die Reduktion des Platzbedarfs auf den Schüttelinkubatoren.

5.4 Ergebnisse mit der Referenzchemikalie PCP

Nach Optimierung aller Techniken und Zusammenfassung aller Erfahrungen und Vorschläge, auch der im Interlaboratoriumsvergleich beteiligten Gruppen⁺, wurden die in Abb. 6 für Soja- und Weizenzellkulturen vergleichend dargestellten Metabolisierungsanteile und Umsatzraten für PCP erhalten.

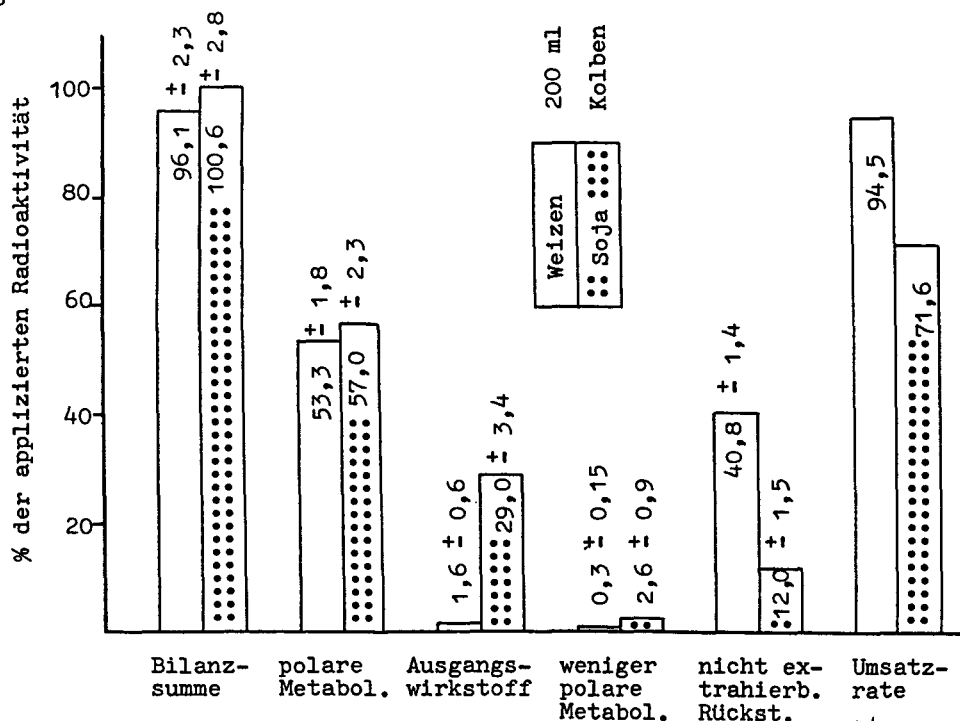


Abb. 6: Metabolisierungs- und Umsatzraten von ^{14}C -PCP (1 mg/l) in Weizen- und Sojazellkulturen. Mittelwerte aus je 6 Einzelmessungen.

Mit PCP werden in beiden Kulturen hohe Umsatzraten erreicht. In der Weizenkultur werden im Vergleich zu Soja verhältnismäßig große Anteile des PCP (fast 41 %) nicht extrahierbar zurückgehalten. Offensichtlich besteht für die Zelle die Möglichkeit, über die phenolische OH-Gruppe PCP in die Zellwandbestandteile der ligninreicheren Weizenzelle einzubauen.

* Die Messungen wurden im Rahmen der gemeinsamen Ringtest-Untersuchungen (s. nächster Beitrag), die in 200 ml-Kolben durchgeführt wurden, von der Arbeitsgruppe H. Sandermann, Biologisches Institut II in Freiburg, durch D. Scheel dankenswerter Weise vorgenommen.

⁺ s. nachfolgenden Gemeinschaftsbericht.

5.5 Ergebnisse mit der Referenzchemikalie DEHP

Aus der Reihe der im Gesamtprojekt vorgeschlagenen Referenzchemikalien wurde auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften und ubiquitären Verbreitung die Umweltchemikalie Di-(2-äthylhexyl)-[^{14}C -carboxyl]-phthalat (DEHP) mit in die Untersuchungen eingeschlossen. In beiden Systemen, Soja und Weizen, wurden nur geringe Umsätze erzielt (Abb. 7). Obwohl im Falle der Sojakultur über 75 % der applizierten Radioaktivität und im Fall

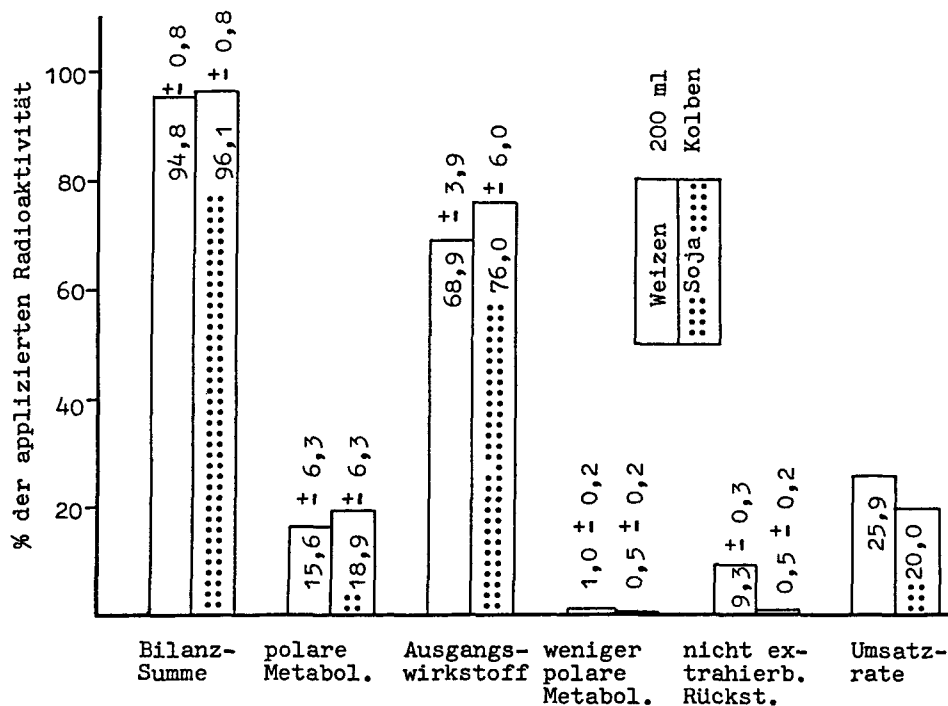


Abb. 7: Metabolisierungs- und Umsatzraten von ^{14}C -DEHP (1 mg/l) in Weizen und Sojazellkulturen. Mittelwerte aus je 4 - 6 Einzelmessungen.

der Weizenkulturen sogar mehr als 85 % von den Zellen aus dem Nährmedium aufgenommen wurden, beträgt die Gesamtmetabolisierungsrate nur 24 % bzw. 11 %. Offensichtlich lagert sich das lipophile DEHP an die Zellen an, ohne entscheidend in die Zellen einzudringen und anschließend metabolisiert zu werden.

5.6 Ergebnisse mit dem herbiziden Wirkstoff Monolinuron

In den Versuchen mit dem herbiziden Wuchsstoff 2,4-D ergaben sich in der Weizenkultur hohe Metabolisierungsraten, in der Sojakultur dagegen geringe. Da 2,4-D ständig als Wuchsstoff im Nährmedium vorhanden ist (bei Weizen zu 2 mg/l, bei Soja 1 mg/l), erschien es lohnend, einen herbiziden Wirkstoff ohne

Wachstumsstoffwirkung ebenfalls im System zu testen. Aufgrund der bereits vorliegenden Metabolismusdaten in Pflanzen, wie Spinat und Kresse, wurde Monolinuron 3-(4-Chlorphenyl)-[¹⁴C-phenyl]-1-methyl-1-methoxyharnstoff gewählt. Die Ergebnisse sind vergleichend für Weizen und Soja in Abb. 8 dargestellt.

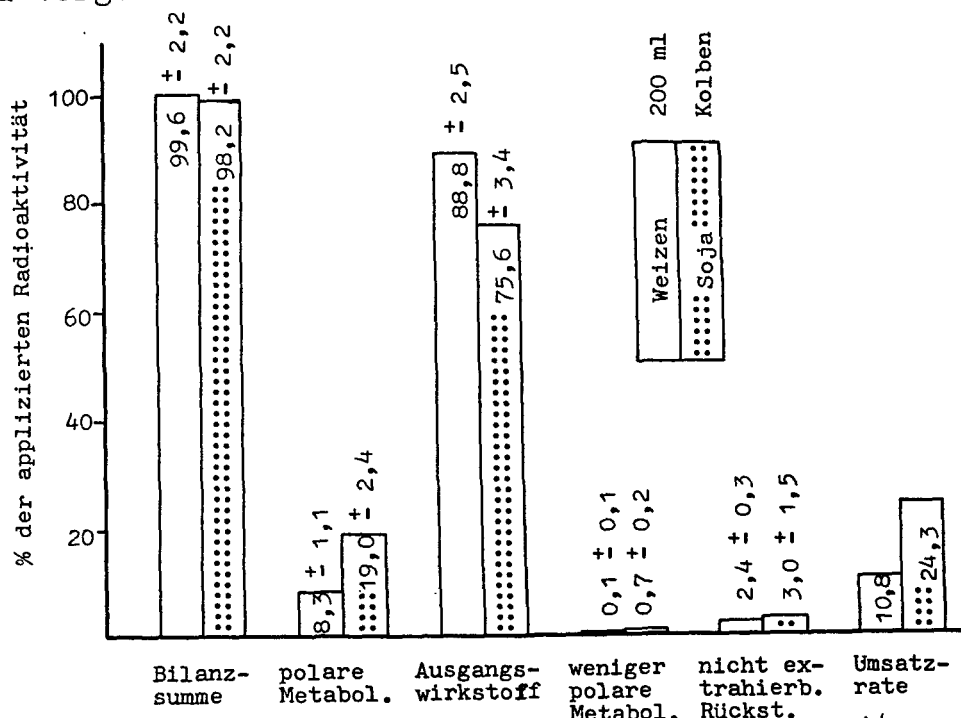


Abb. 8: Metabolisierungs- und Umsatzraten von ¹⁴C-Monolinuron (1 mg/l) in Weizen- und Sojazzellkulturen. Mittelwert aus je 6 Einzelmessungen.

Die extrem geringe Umsatzrate von nur knapp 11 % in der Weizenkultur ist offensichtlich einerseits begründet in einer geringen Aufnahme von Monolinuron durch die Zellen aus dem Nährmedium und andererseits in einer geringen Verstoffwechselung. Das Wachstum der Zellkulturen war nicht beeinflusst. In den Zellen beider Kulturen wurden übereinstimmend etwa 14 % der ins Nährmedium applizierten Radioaktivität nachgewiesen. Dieser Anteil wird vergleichshalber dem entsprechenden von Pflanzen aufgenommenen Radioaktivitätsanteil - aufgenommen aus nicht sterilem Boden - gegenübergestellt*. Nach 31 Tagen hatte eine Spinatkultur 4,1 % der applizierten Radioaktivität (Monolinuron)

* I. Schuphan and W. Ebing, Metabolism and Balance Studies of ¹⁴C-Monolinuron after Use in Spinach Followed by Cress and Potato Cultures. Pesticide Biochem. Physiol. 9 (1978) 107-118.

aufgenommen, die danach gesäte Nachfolgekultur Kresse nahm innerhalb von weiteren 10 Tagen nochmals 5,6 % auf. Diese entsprechenden Anteile aufgeschlüsselt nach Ausgangswirkstoff und Metaboliten stellt die Tab. 1 zusammen.

	Zellkultur		Intakte Pflanzen	
	Weizen	Soja	Spinat	Kresse
Ausgangswirkstoff	72,7	47,2	7,6	54,5
polare Metaboliten	10,4	31,9	52,2	22,9
weniger pol. Metab.	0,28	0,88	13,4	15,4
nicht extrahierb. Rückstände	16,9	20,1	26,8	7,1

Tab.1: Vergleich der von Zell- und Pflanzenkulturen aufgenommenen Radioaktivitätsanteile (Monolinuron-Applikation).

Wegen der sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen und nicht übereinstimmenden Pflanzenarten erstaunt es nicht, daß die *q u a n t i t a t i v e n* Daten wenig korrespondieren. Durch weitergehenden Vergleich der identifizierten Metaboliten aus polarem und weniger polarem Metabolitenanteil bei Spinat und Kresse auf der einen und Soja- und Weizenkultur auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, daß *q u a l i t a t i v* das Metabolitenmuster in allen vier Fällen übereinstimmt, aber auch hier die Quantitäten variieren.

Eine gleiche qualitative Übereinstimmung des Metabolitenmusters konnte auch an Hand eines Vergleichs der in der Literatur beschriebenen Metaboliten in intakten Pflanzen und denen, nachgewiesen in den Zellkulturen bei 2,4-D gefunden werden.

Für die Beurteilung des Testes genügt es vollends, daß reproduzierbar pflanzenphysiologische Leistungen in einem in vitro-Test genutzt werden, die in annähernder Übereinstimmung mit intakten Pflanzen stehen. Durch die standardisierte Methodik können immer unter den gleichen Bedingungen Prüfchemikalien serienmäßig in einem pflanzlichen System getestet und relativ zueinander bewertet werden. Der direkte Bezug zu intakten Pflanzen einer bestimmten Art wird dabei überflüssig, wie die verschiedenen Ergebnisse zwischen einzelnen Pflanzen selber oder gar unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen zeigen.

5.7 Geschlossene Arbeitstechnik mit gleichzeitiger Erfassung von Mineralisierungs- und Verdampfungsanteilen

Die hier verwendete und im Anhang I beschriebene "normale" Methodik erlaubt es nicht, eine leicht mineralisierbare und flüchtiggehende organische Chemikalie in ihrem quantitativen Metabolismusverhalten vollständig zu erfassen. Aufgrund der entstehenden Verluste wären Berechnungen von Umsatzraten unbrauchbar. Stellt sich bei Untersuchungen unter "normaler" Arbeitsweise heraus, daß die Bilanz unter 90 % liegt, so sollte unter kontrolliert belüfteten Bedingungen unter Verwendung der "geschlossenen" Variante (Anhang I, Kap. 1.5.4) gearbeitet werden. Der Unterschied zur "normalen" Versuchsführung besteht darin, daß die Applikation der ^{14}C -Testchemikalie in das Nährmedium einer geschlossenen, kontrolliert mit steriler Luft belüfteten Apparatur erfolgt (s. Anlage 5). Verdampfende Wirkstoff- und organische Metabolitenanteile werden in Polyurethanschaumstopfen aufgefangen und anschließend quantitativ bestimmt. Gebildetes $^{14}\text{CO}_2$, Endmineralisierungsprodukt der Prüfchemikalie, wird in Absorptionsfallen gebunden und quantitativ vermessen. Die in Soja- und Weizenzellkulturen mit einigen Prüfchemikalien erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 2 dargestellt.

	% der applizierten Radioaktivität				
	$^{14}\text{CO}_2$	Flüchtige org. Anteile	Nähr- medium	Zellen	Summe
Dichlofluanid	30,5 (18,6)	3,1 (2,8)	11,9 (54,8)	50,3 (22,3)	95,8 (98,6)
Lindan	0,1	47,5	9,4	45,9	102,9
Parathion	0,2 (0,6)	8,1 (2,5)	33,8 (28,7)	62,4 (67,9)	104,5 (99,7)
Pentachlor- phenol	1,5 (0,2)	0,2 (2,8)	8,3 (40,1)	99,9 (56,1)	109,9 (99,2)

Tab. 2: Bilanzierung des Verhaltens von Prüfchemikalien in Weizen- und Soja()-Zellkulturen in kontrolliert belüfteten Inkubationskolben ("geschlossene" Variante) mit Erfassung des Mineralisierungsproduktes CO_2 und der flüchtigen organischen Anteile (Mittelwerte aus 4 Wiederholungen, Inkubationsdauer 2 Tage bei Soja, 4 Tage bei Weizen).

Vielen Prüfchemikalien ist auf Grund ihrer bekannten Dampfdrucke und ihrer chemischen Struktur nicht ohne weiteres ihre Tendenz zur Verflüchtigung oder zur schnellen Mineralisierung bestimmter funktioneller Gruppen anzusehen (s. Beispiel Dichlofluorid). Deshalb wird man im allgemeinen die "geschlossene" Variante erst bei einem Mißerfolg (Bilanz < 90 %) im "normalen" Verfahren einsetzen.

6. Folgerungen

Der im Anhang I beschriebene Test soll ermöglichen, organische Chemikalien im Hinblick auf ihre Metabolisierbarkeit in einem pflanzlichen in vitro-Test zu beurteilen. Erster Schritt dabei könnte die Einordnung der Prüfchemikalien in eine steigende oder fallende Reihenfolge entsprechend ihrer Metabolisierbarkeiten sein, wodurch relative Angaben über ihr Persistenzverhalten in diesem pflanzlichen in vitro-System erhalten würden. Daraufhin müßten diese Ergebnisse in Vergleich zu weiteren Angaben aus anderen Umwelt-Einzeltests gesetzt werden, um eine ganzheitliche Beurteilung der Prüfchemikalie zu ermöglichen.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen von 4 Prüfchemikalien soll versucht werden, diese 4 Substanzen nach steigender Metabolisierbarkeit anhand ihrer Umsatzraten einzuordnen und - wenn möglich - mit anderen Daten zu vergleichen.

Da der Test mit zwei Zellkulturen verschiedener Pflanzenarten (Monokotyle, Dikotyle) durchgeführt wird, soll vorläufig - bis zum Vorliegen von Untersuchungsdaten weiterer Prüfchemikalien - eine gemittelte Umsatzrate aus beiden Zellkulturen verwendet werden.

Nach dieser Mittelung ergibt sich folgende Reihung der untersuchten Verbindungen nach steigender Metabolisierbarkeit:

Monolinuron	<	DEHP	<	2,4-D	<	PCP
17,6 %		23,0%		57,2 %		83,1 %.

Versuchsweise wurden diese Ergebnisse einmal anderen Einzeltests vergleichend zugeordnet (Abb. 9).

Dieses Beispiel kann erste Hinweise auf eine mögliche zukünftige Verwendung der Daten des Tests im Rahmen der prospektiven Bewertung von Umweltchemikalien aufzeigen.

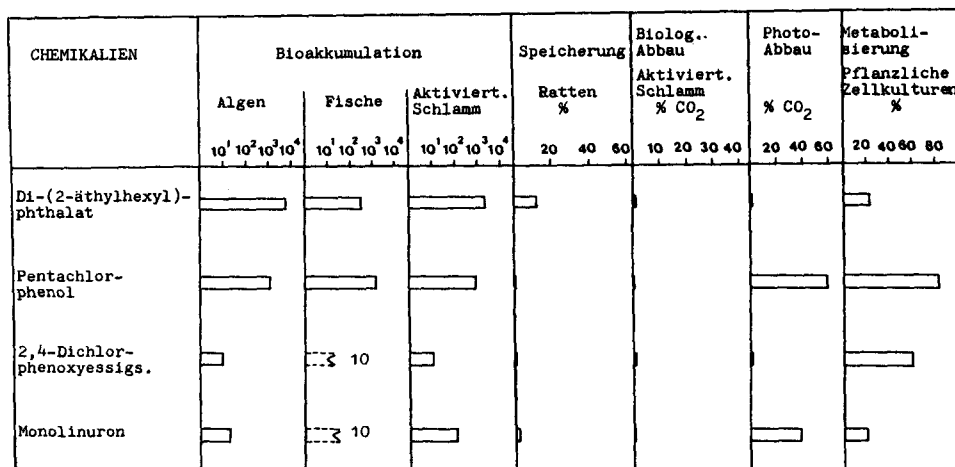


Abb. 9: Vergleichende Zuordnung der erhaltenen Metabolisierungsdaten aus Zellkulturen in ein Raster bekannter Screening-Teste*.

* D. Freitag, H. Geyer, A. Kraus, R. Viswanathan, D. Kotzias, A. Attar, W. Klein and F. Korte: Ecotoxicological Profile Analysis, VII. Screening Chemicals for Their Environmental Behavior by Comparative Evaluation. Ecotox. and Environm. Safety 6 (1982) 60-81.

7. Veröffentlichungen

Im Rahmen der Arbeiten wurden bisher folgende Veröffentlichungen vorgenommen:

A. Haque, I. Schuphan and W. Ebing, Metabolism of Pesticides in Plant Tissue Cultures to Evaluate the Quantitative Aspects of Metabolism. The Fifth International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC), Kyoto, Aug. 29 - Sept. 4, 1982, Abstracts Vf-4.

A. Haque, W. Ebing and I. Schuphan, A simple method to evaluate the quantitative metabolism including mineralization and volatilization of pesticides in plant cell cultures. Chemosphere (submitted).

Bundesminister für Forschung und Technologie

Forschungsteilbericht (03 72 70 8, 03 72 71 9, 03 72 72 0)

Gemeinsame Ringuntersuchungen für den Schnelltest
zur Ermittlung der Metabolismusleistung
von pflanzlichen Zellkulturen gegenüber organischen Chemikalien

Berichtersteller:

W. Ebing, H. Harms, H. Sandermann

Beteiligte Arbeitsgruppen:

D. Scheel, K.T. von der Trenck, H. Sandermann
Albert-Ludwigs-Universität, Biologisches Institut II,
Lehrstuhl für Biologie der Pflanzen, Freiburg i.Br.

C. Langebartels, H. Harms
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL),
Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Braunschweig-Völkenrode

I. Schuphan, A. Haque, W. Ebing
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),
Institut für Pflanzenschutzmittelforschung, Berlin

Mai 1983

Zusammenfassung

In diesem gemeinsamen Forschungsbericht werden die Ringversuche erläutert, die die Entwicklung eines Schnelltestes zur Ermittlung der Metabolismusleistung steriler, pflanzlicher Zellsuspensionskulturen gegenüber organisch-chemischen Fremdstoffen begleiteten. Der Test gibt Auskunft über die Umsatzraten bei den untersuchten Testsubstanzen unter standardisierten Bedingungen und trägt damit - neben anderen Daten - zur Abschätzung der zu erwartenden, im Vergleich zu anderen Stoffen relativen Persistenz bei. Die mit radioaktiv markierter Prüfsubstanz durchzuführende Methode gestattet, neben dem Prozentsatz an Ausgangssubstanz die Anteile stärker polarer und weniger polarer Metaboliten sowie der nicht extrahierbaren Rückstände zu ermitteln und durch die Erstellung der Bilanzsumme die Qualität der Testdurchführung zu überprüfen.

Ringversuche wurden mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Pentachlorphenol und Di-(2-ethylhexyl)-phthalat appliziert an Weizen- und Sojazellen durchgeführt. Bei Schwankungen der Werte im Interlaboratoriumsvergleich bis zu 20 % und bei erzielten Bilanzsummen von meistens 90 - 100 % kann der Test als gut brauchbar angesehen werden.

Summary

This joint paper reports on collaborative studies conducted during the course of developing a rapid screening test procedure to evaluate the metabolism of organic environmental chemicals in sterile plant cell suspension cultures. The results present data concerning the metabolic turnover of compounds obtained under standardised conditions. They give information on the percentages of unchanged parent compound, polar and non-polar metabolites and as well as non-extractable residues. The recovery balance along with the statistical variations permit to determine the quality of the results. The data obtained with radiolabelled compounds allow to contribute in the evaluation of relative persistence of chemicals.

The collaborative studies had been conducted with 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, pentachlorophenol and di-(2-ethylhexyl) phthalate employing cell suspension cultures of soybean and wheat. The balance sums accounted mostly up to 90 - 100 %. The inter-laboratory comparison showed that the values obtained agreed to + 20 %.

These collaborative studies document the value of the standardised, rapid and inexpensive in vitro assay for the determination of metabolic turnover of organic chemicals.

1. Einleitung

Die Ringuntersuchungen dienen dem Zweck, eine Methode zur schnellen Ermittlung des Umwandlungs- und Abbauvermögens standardisierter pflanzlicher Zellkulturen gegenüber organisch-chemischen Verbindungen zu entwickeln und zu erproben. Durch die Kultur in sterilen Nährmedien unter konstanten Temperatur-, Licht- und Gasaustauschbedingungen können in diesem System abiotische Faktoren und mikrobielle Einflüsse weitgehend kontrolliert bzw. ausgeschaltet werden.

Die Sicherung der Verlässlichkeit experimenteller Daten ist entscheidend für die Brauchbarkeit einer solchen Methode. Aus diesem Grunde wurde der Test in hohem Grade standardisiert. Die unter Ringtestbedingungen erzielten Ergebnisse tragen dazu bei, das unterschiedliche Abbau- und Metabolismungsverhalten von Chemikalien vergleichend zu bewerten.

2. Testmethodik

In Anlehnung an früher erworbene Erfahrungen (1,2) wurden standardisierte Zellkulturen mit der an geeigneter Stelle radioaktiv markierten Testchemikalie inkubiert. Es wurden eine dikotyle (Soja) und eine monokotyle (Weizen) Pflanzenart verwendet. Beide Kulturen waren seit mehr als 5 Jahren in Suspensionskultur unter konstanten Bedingungen subkultiviert worden. Die Inkubation lag in der späten logarithmischen Wachstumsphase und dauerte 48 Stunden.

Danach wurden Zellen und Nährmedium getrennt und die Zellen nach Bligh-Dyer extrahiert. Die Radioaktivitätsanteile im Nährmedium, im Zellextrakt und im nicht löslichen Rückstand wurden bestimmt.

Im 2. Schritt wurden Nährmedium und Zellextrakt dünnschichtchromatographisch differenziert, um die Anteile an unveränderter Verbindung und Metaboliten zu ermitteln und um über die polare oder weniger polare Natur der gebildeten Metaboliten Aufschluß zu erhalten.

...

(1) H. Harms (1973) Landbauforsch. Völkenrode 23, 127-132

(2) H. Sandermann, H. Diesperger und D. Scheel (1977) in Plant Tissue Culture and Its Bio-Technological Application (hrsg. W. Barz, E. Reinhard, M.H. Zenk) pp. 178 - 196, Springer-Verlag, Berlin

Abb. 1: Schnelltest für Metabolisierung von Chemikalien durch pflanzliche Zellkulturen

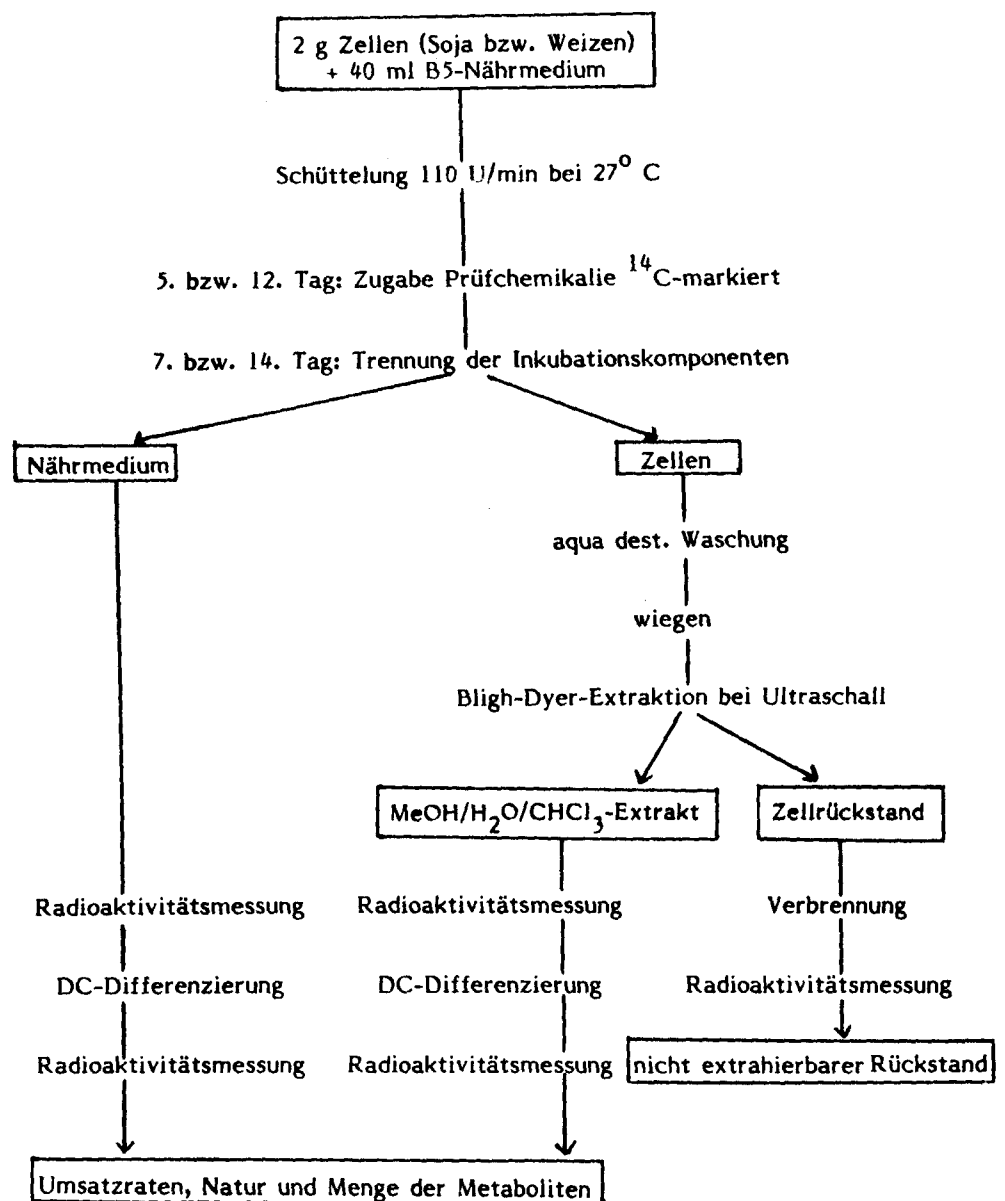


Tabelle 1: T E S T - CHARAKTERISTIKA

Screeningtest zur Ermittlung der M e t a b o l i s i e r b a r k e i t von Umweltchemikalien d u r c h P f l a n z e n z e l l k u l t u r e n , mit der Absicht,

- die geprüften Chemikalien in eine R e i h e n f o l g e einzuordnen: ... mehr umsetzbar als - weniger umsetzbar als ...
- die Größenordnung der Ab- und Umbauleistung von Zellkulturen je einer m o n o - und einer d i k o t y l e n P f l a n z e n a r t zu ermitteln.

V e r w e n d u n g s b e r e i c h : polare bis unpolare, in Wasser leicht bis schwerlösliche Verbindungen.

Der Test macht q u a n t i t a t i v e A u s s a g e n unter den Standardbedingungen der Methodik

- zum nicht abgebauten Anteil des Prüfstoffes
- zum nicht extrahierbar gebundenen Anteil
- zur Menge und zur Natur der gebildeten Metaboliten.

G e n a u i g k e i t im Inter-Laboratoriumsvergleich:
Mittelwertstrebereich der Umsatzraten 20 % (bezogen auf die gefundenen Umsatzgrößen)

Die Methodik stellt einen S c h n e l l t e s t dar:

- Experimentelle Testdauer für einen 6-Parallelen-Ansatz: 5 Arbeitstage
- P e r s o n a l b e d a r f : 1 chemisch-technische Assistentin ganztätig
- V e r b r a u c h s m a t e r i a l a u f w a n d für beide Testreihen: 180,- DM (ohne Investitionen und Prüfchemikalie)
- Vorbedingung: Die Prüfchemikalie muß r a d i o a k t i v m a r k i e r t (^{14}C) vorliegen.

S c h l u ß f o l g e r u n g e n durch Einordnen des Prüfstoffes in eine Testdatenreihe zwischen Referenzchemikalien, von denen weitere Daten über das Verhalten in der Umwelt bekannt sind.

Abb. 1 unterrichtet über den Entwicklungsstand der Methodik zum Zeitpunkt der Abfassung dieses Berichtes. In Tab. 1 wird der Test knapp und übersichtlich charakterisiert.

Im methodischen Teil (Abschnitt 7) ist die den Ringuntersuchungen zugrunde liegende Laborvorschrift wiedergegeben. Allerdings stellt sie lediglich den letzten Stand am Ende der schrittweisen Entwicklung und der begleitenden Diskussionen im Verlaufe von 7 Arbeitsbesprechungen dar, in denen 5 Ringversuche vorbereitet, ausgewertet und weiter entwickelt wurden. Zugunsten einer einfachen Durchführbarkeit für Routinezwecke wurde bewußt nicht angestrebt, eine detaillierte Charakterisierung der entstehenden Metaboliten zu erreichen. Wesentlich erschien uns aber für die Berechnung der Umsatzraten, daß eine Differenzierung in Ausgangsstoff und Umwandlungsprodukte vorgenommen wurde.

3. Ringuntersuchungen mit 2.4-D

Im ersten Ringversuch mit der Prüfchemikalie ^{14}C -2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) wurde vorerst nur die Reproduzierbarkeit der Radioaktivitätsverteilung nach Anwendung des Aufarbeitungsschemas (Abb. 1) in Nährmedium, Chloroform- und Methanol/Wasser-Extrakt untersucht. In Tab. 2 sind die Ergebnisse (ohne dünnschichtchromatographische Differenzierung) zusammengestellt. Darin sind die Radioaktivitätsprozente mit den zugehörigen Vertrauensbereichen angegeben, in denen mit 95 % Wahrscheinlichkeit der jeweilige Mittelwert liegt. Berechnet wurden die Radioaktivitätsanteile für das zellfreie Nährmedium, die Methanol/Wasser- sowie die Chloroform-Phase aus der Bligh/Dyer-Extraktion, für den extrahierten Zellrückstand und schließlich die Gesamtheit der Radioaktivität pro Ansatz aus den 4 Fraktionen als "Bilanzsumme".

Der Vergleich der ersten Ergebnisse aus den drei Laboratorien stellte uns seinerzeit noch nicht ganz zufrieden. Unter den verschiedenen Einfluß nehmenden Faktoren wurde auch die unterschiedliche Frischgewichtszunahme der Zellkulturen vermutet. Deshalb wurden die Umwandlungsraten auf das Gramm Frischgewicht bezogen dargestellt, was aber keine Verbesserung der Übereinstimmung ergab. Insbesondere wurde angestrebt, den auf Extraktinhalte bezo-

Tabelle 2: ^{14}C -2,4-D-Ringtest mit Weizenzeilsuspensionskultur

Ansatz: 2 g Zellmaterial, 9. Tag ^{14}C -Applikation von 2 mg/l = $\sim 10^6$ dpm,

14. Tag Aufarbeitung. Je Labor 5 bis 10 Einzelansätze

Labor	% Radioaktivität pro applizierte Gesamtmenge $\pm s_{0,95}$				
	Nährmedium	CHCl_3 -Extrakt	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ -Extrakt	nicht extrahierbar	Bilanzsumme
A	4,0 \pm 0,9	15,7 \pm 2,4	66,2 \pm 3,4	11,2 \pm 0,6	97,1 \pm 3,5
B	5,4 \pm 2,3	6,5 \pm 1,1	77,9 \pm 12,5	5,9 \pm 1,5	95,8 \pm 13,6
C	12,0 \pm 1,6	14,8 \pm 2,0	64,5 \pm 2,9	14,2 \pm 2,9	105,4 \pm 3,0

genen Radioaktivitätswerten eine konkrete Bedeutung zu verleihen. Daher wurden bei 2,4-D-Ansätzen mit Sojazeilkkulturen diverse Versuche zur dünn-schichtchromatographischen Charakterisierung durchgeführt, dies aber noch nicht im Ringversuch.

4. Ringuntersuchungen mit PCP

Mit der nächsten ausgewählten Prüfchemikalie $^{14}\text{C}_{(\text{Phenyl})}$ -Pentachlorphenol (PCP) wurde die Methode um eine dünn-schichtchromatographische Differenzierung in die Ausgangsverbindung und deren Umwandlungsprodukte unter Anwendung verbesserter Aufarbeitungstechniken und nach Ermittlung günstiger, dünn-schichtchromatographischer Bedingungen erweitert.

Diese Weiterentwicklung schlägt sich in der wesentlich konkreteren Darstellungsmöglichkeit nieder, von der bei der Wiedergabe der Ringversuchsergebnisse von PCP mit Weizenzeilsuspensionskulturen Gebrauch gemacht wurde (Tab. 3). Differenziert wurde in die unveränderte Testchemikalie, ihre stärker polaren Metaboliten, die einen geringeren R_f -Wert besitzen, und in die weniger polaren Metaboliten mit höherem R_f -Wert als die Ausgangssubstanz. Die nach der Differenzierung vorliegenden Daten geben anhand der Umsatz-rate (Bilanzsumme minus Anteil Ausgangswirkstoff) Aufschluß über die Persistenz und die Metabolisierbarkeit der Testchemikalie PCP durch Weizenzeilkulturen und stellen somit die angestrebte Testaussage dar.

Abb. 1 unterrichtet über den Entwicklungsstand der Methodik zum Zeitpunkt der Abfassung dieses Berichtes. In Tab. 1 wird der Test knapp und übersichtlich charakterisiert.

Im methodischen Teil (Abschnitt 7) ist die den Ringuntersuchungen zugrunde liegende Laborvorschrift wiedergegeben. Allerdings stellt sie lediglich den letzten Stand am Ende der schrittweisen Entwicklung und der begleitenden Diskussionen im Verlaufe von 7 Arbeitsbesprechungen dar, in denen 5 Ringversuche vorbereitet, ausgewertet und weiter entwickelt wurden. Zugunsten einer einfachen Durchführbarkeit für Routinezwecke wurde bewußt nicht angestrebt, eine detaillierte Charakterisierung der entstehenden Metaboliten zu erreichen. Wesentlich erschien uns aber für die Berechnung der Umsatzraten, daß eine Differenzierung in Ausgangsstoff und Umwandlungsprodukte vorgenommen wurde.

3. Ringuntersuchungen mit 2,4-D

Im ersten Ringversuch mit der Prüfchemikalie ^{14}C -2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) wurde vorerst nur die Reproduzierbarkeit der Radioaktivitätsverteilung nach Anwendung des Aufarbeitungsschemas (Abb. 1) in Nährmedium, Chloroform- und Methanol/Wasser-Extrakt untersucht. In Tab. 2 sind die Ergebnisse (ohne dünnschichtchromatographische Differenzierung) zusammengestellt. Darin sind die Radioaktivitätsprozente mit den zugehörigen Vertrauensbereichen angegeben, in denen mit 95 % Wahrscheinlichkeit der jeweilige Mittelwert liegt. Berechnet wurden die Radioaktivitätsanteile für das zellfreie Nährmedium, die Methanol/Wasser- sowie die Chloroform-Phase aus der Bligh/Dyer-Extraktion, für den extrahierten Zellrückstand und schließlich die Gesamtheit der Radioaktivität pro Ansatz aus den 4 Fraktionen als "Bilanzsumme".

Der Vergleich der ersten Ergebnisse aus den drei Laboratorien stellte uns seinerzeit noch nicht ganz zufrieden. Unter den verschiedenen Einfluß nehmenden Faktoren wurde auch die unterschiedliche Frischgewichtszunahme der Zellkulturen vermutet. Deshalb wurden die Umwandlungsraten auf das Gramm Frischgewicht bezogen dargestellt, was aber keine Verbesserung der Übereinstimmung ergab. Insbesondere wurde angestrebt, den auf Extraktinhalte bezo-

Tabelle 2: ^{14}C -2,4-D-Ringtest mit Weizenzeilsuspensionskultur

Ansatz: 2 g Zellmaterial, 9. Tag ^{14}C -Applikation von 2 mg/l $\approx 10^6$ dpm,

14. Tag Aufarbeitung. Je Labor 5 bis 10 Einzelansätze

Labor	% Radioaktivität pro applizierte Gesamtmenge $\pm s_{0,95}$				
	Nährmedium	CHCl_3 -Extrakt	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ -Extrakt	nicht extrahierbar	Bilanzsumme
A	4,0 \pm 0,9	15,7 \pm 2,4	66,2 \pm 3,4	11,2 \pm 0,6	97,1 \pm 3,5
B	5,4 \pm 2,3	6,5 \pm 1,1	77,9 \pm 12,5	5,9 \pm 1,5	95,8 \pm 13,6
C	12,0 \pm 1,6	14,8 \pm 2,0	64,5 \pm 2,9	14,2 \pm 2,9	105,4 \pm 3,0

genen Radioaktivitätswerten eine konkrete Bedeutung zu verleihen. Daher wurden bei 2,4-D-Ansätzen mit Sojazellkulturen diverse Versuche zur dünn-schichtchromatographischen Charakterisierung durchgeführt, dies aber noch nicht im Ringversuch.

4. Ringuntersuchungen mit PCP

Mit der nächsten ausgewählten Prüfchemikalie $^{14}\text{C}_{(\text{Phenyl})}$ -Pentachlorphenol (PCP) wurde die Methode um eine dünn-schichtchromatographische Differenzierung in die Ausgangsverbindung und deren Umwandlungsprodukte unter Anwendung verbesserter Aufarbeitungstechniken und nach Ermittlung günstiger, dünn-schichtchromatographischer Bedingungen erweitert.

Diese Weiterentwicklung schlägt sich in der wesentlich konkreteren Darstellungsmöglichkeit nieder, von der bei der Wiedergabe der Ringversuchsergebnisse von PCP mit Weizenzeilsuspensionskulturen Gebrauch gemacht wurde (Tab. 3). Differenziert wurde in die unveränderte Testchemikalie, ihre stärker polaren Metaboliten, die einen geringeren R_f -Wert besitzen, und in die weniger polaren Metaboliten mit höherem R_f -Wert als die Ausgangssubstanz. Die nach der Differenzierung vorliegenden Daten geben anhand der Umsatzrate (Bilanzsumme minus Anteil Ausgangswirkstoff) Aufschluß über die Persistenz und die Metabolisierbarkeit der Testchemikalie PCP durch Weizenzeilkulturen und stellen somit die angestrebte Testaussage dar.

Tabelle 3: ^{14}C -PCP-Ringtest mit Weizenzeilsuspensionskultur

Ansatz: 2 g Zellmaterial, 12. Tag ^{14}C -Applikation von 1 mg/l = $1,0 \times 10^6$ dpm,

14. Tag Aufarbeitung. Je Labor 6 bis 10 Einzelansätze

Labor	% Radioaktivität pro applizierte Gesamtmenge $\pm 5_{0,95}$					Umsatz- rate	Summe
	Ausgangs- wirkstoff	polare Metabo- litenfraktion	weniger polare Metaboliten- fraktion	nicht extrahier- bare Rückstände			
A	1,88 \pm 1,11	56,28 \pm 3,74	0,0	21,61 \pm 5,63		77,67	79,77 \pm 9,81
B	3,04 \pm 0,73	51,55 \pm 2,62	0,14 \pm 0,04	37,59 \pm 1,29		88,80	91,84 \pm 2,32
C	1,63 \pm 0,56	53,33 \pm 1,77	0,31 \pm 0,15	40,82 \pm 1,43		94,45	96,08 \pm 2,28

In diesem Versuch ist die hohe Umsatzrate des PCP hervorzuheben; nur etwa 3 % der applizierten Testchemikalie wurden in unveränderter Form wiedergefunden.

In der Regel ließen sich bei PCP als Testchemikalie Bilanzen über 90 % erreichen. Eine geringere Gesamtwiederfindensrate zeigt einen möglicherweise vorher nicht wahrgenommenen, systematischen Fehler im Versuchsablauf an, z.B. bei der Bestimmung der nicht extrahierbaren Radioaktivität durch unvollständige Verbrennung. Ansonsten ist die Übereinstimmung der Werte zufriedenstellend. Im Vergleich zum 2,4-D wurde ein auffällig hoher Anteil der Radioaktivität des PCP in die Fraktion des unlöslichen Rückstands eingebaut.

Entsprechende Ergebnisse von einem mit PCP und Sojazeilskulturen durchgeführten Ringversuch sind in Tab. 4 dargestellt. Möglicherweise ist die hier wesentlich geringere Umsatzrate für PCP im Vergleich zur Weizenzeilkultur durch Unterschiede der enzymatischen Ausstattung der Zellen bei den beiden Pflanzenarten hervorgerufen worden. Die Daten in Tab. 4 weisen ein übereinstimmendes Gesamtergebnis aus, mit dem die Untersuchungen über PCP als abgeschlossen betrachtet werden konnten. Dieses Ergebnis ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die Methodik dahingehend vereinfacht wurde, indem auf die Trennung der Bligh/Dyer-Extraktionsphasen verzichtet und eine Differenzierung des Gesamtextraktes vorgenommen wurde.

Tabelle 4: ^{14}C -PCP-Ringtest mit Sojazellsuspensionskultur

Ansatz: 2 g Zellmaterial, 5. Tag ^{14}C -Applikation von 1 mg/l = $1,0 \times 10^6$ dpm,
7. Tag Aufarbeitung. Je Labor 6 - 10 Einzelansätze

Labor	% Radioaktivität pro applizierte Gesamtmenge $\pm 50,95$					Summe
	Ausgangswirkstoff	polare Metabolitenfraktion	weniger polare Metabolitenfraktion	nicht extrahierbare Rückstände	Umsatzrate	
A	27,55 \pm 3,36	59,86 \pm 2,51	0,20 \pm 0,07	7,06 \pm 1,31	67,13	94,68 \pm 2,53
B	25,4 \pm 5,4	61,8 \pm 7,1	0,0	11,3 \pm 2,3	73,10	98,5 \pm 9,7
C	29,0 \pm 3,43	56,99 \pm 2,33	2,63 \pm 0,91	12,03 \pm 1,45	71,64	100,64 \pm 2,75

5. Ringuntersuchungen mit DEHP

Im letzten Förderungszeitraum wurde die Methodik mit einer zur Gruppe der apolaren Verbindungen gehörenden, wenig wasserlöslichen Prüfchemikalie, Di-(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP), getestet. Die Daten eines Ringversuches mit Sojazellkulturen sind in Tab. 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: ^{14}C -DEHP-Ringtest mit Sojazellsuspensionskultur

Ansatz: 2 g Zellmaterial, 5. Tag ^{14}C -Applikation von 1 mg/l = $1,0 \times 10^6$ dpm,
7. Tag Aufarbeitung. Je Labor 6 Einzelansätze

Labor	% Radioaktivität pro applizierte Gesamtmenge $\pm 50,95$					Summe
	Ausgangswirkstoff	polare Metabolitenfraktion	weniger polare Metabolitenfraktion	nicht extrahierbare Rückstände	Umsatzrate	
A	74,78 \pm 3,41	20,14 \pm 1,83	0,0	0,62 \pm 0,30	20,76	95,54 \pm 4,43
B	75,3 \pm 11,18	23,5 \pm 10,39	0,0	0,40 \pm 0,17	23,9	99,1 \pm 3,79
C	76,03 \pm 5,96	18,94 \pm 6,28	0,49 \pm 0,16	0,54 \pm 0,20	20,03	96,06 \pm 0,81

Die Übereinstimmung zwischen den Laboratorien und die Bilanzsummen konnten als sehr gut betrachtet werden. Routinemäßig wurde die ausgearbeitete Testmethode auch noch bei DEHP und Weizenzellkulturen angewendet. Tab. 6 weist die Ergebnisse dieser Testanwendung aus. Die Bilanzsummen lagen dabei um 90 %, die Übereinstimmung zwischen den Laboratorien innerhalb jeder der differenzierten Stoffgruppen kann als zufriedenstellend betrachtet werden.

Tabelle 6: ^{14}C -DEHP-Ringtest mit Weizenzeilsuspensionskultur

Ansatz: 2 g Zellmaterial, 12. Tag ^{14}C -Applikation von 1 mg/l = $1,0 \times 10^6$ dpm,
14. Tag Aufarbeitung. Je Labor 4 - 8 Einzelansätze

Labor	% Radioaktivität pro applizierte Gesamtmenge $\pm 5_{0,95}$					Umsatz- rate	Summe
	Ausgangs- wirkstoff	polare Metabo- litenfraktion	weniger polare Metaboliten- fraktion	nicht extrahier- bare Rückstände			
A	55,32 \pm 2,05	24,39 \pm 2,53	0,35 \pm 0,19	7,66 \pm 0,62		32,40	87,72 \pm 2,16
B	64,98 \pm 6,69	20,74 \pm 7,70	1,60 \pm 0,69	3,92 \pm 0,98		26,28	91,24 \pm 1,99
C	68,94 \pm 3,90	15,58 \pm 6,28	0,96 \pm 0,19	9,32 \pm 0,32		25,86	94,80 \pm 0,78

6. Diskussion der Ergebnisse

Zum gegenwärtigen Entwicklungsstand ist die Methodik soweit verbessert worden, daß sie verläßlich reproduzierbare Daten liefert und nunmehr zur routinemäßigen Anwendung empfohlen werden kann. Diese Entwicklungsstufe wird u.a. durch die Ringtests mit DEHP repräsentiert. Danach lassen sich - bei nicht flüchtigen Ausgangs- und Folgeverbindungen - Bilanzsummen zwischen 95 und 100 % erreichen. Die Mittelwerte der Umsatzraten schwanken zwischen den Laboratorien in einem Bereich von nicht mehr als 20 % (bezogen auf die gefundenen Umsatzgrößen in den Tabellen 5 und 6).

Die Einzelwerte einer Testreihe können dabei allerdings - abhängig vom Einarbeitungsgrad des Experimentators - noch in größerem Ausmaße schwanken: Zuweilen streuen die Einzelwerte einer Meßreihe bis zu ± 25 % um den Mittelwert; in der Regel jedoch nur um ± 5 bis 8 %. Es ist also notwendig, für die Prüfung einer Substanz mindestens 5 Parallelansätze auszuwerten. Dies muß berücksichtigt werden, wenn zwischen den Umsatzraten zweier Prüfchemikalien eindeutig unterschieden werden soll.

Für eine statistisch abgesicherte Bewertung stehen bislang noch zu wenig Daten zur Verfügung. Dennoch erlauben die bisherigen Ergebnisse eine routinemäßige Heranziehung dieses Schnelltestes für vergleichende, ökochemische Bewertungen von Chemikalien.

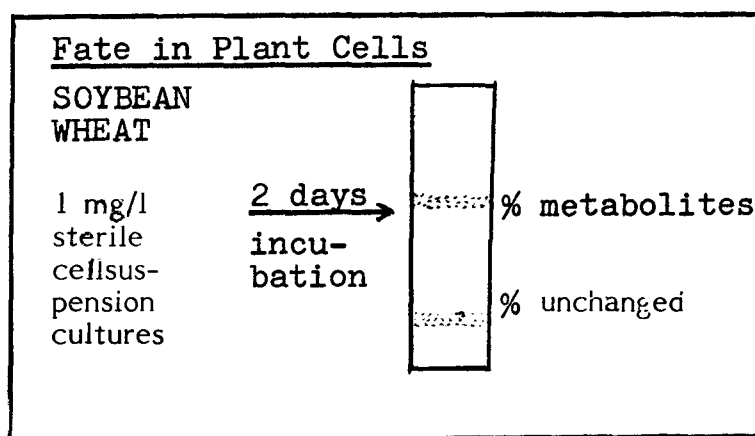
Für die Interpretation der Testergebnisse eignen sich in erster Linie die Umsatzraten. Dabei ist zu beachten, daß es sich um Daten aus einem exakt standardisierten in vitro-System handelt. Anhand der Umsatzraten lassen sich die geprüften Substanzen in eine Reihenfolge abgestufter Metabolisierbarkeit durch die pflanzlichen Zellkulturen ordnen (entweder je eine für die

monokotylen und für die dikotylen Pflanzen oder in nur eine Reihe aus einer Kombination der Ergebnisse aus beiden Kulturen).

Dabei ist es nützlich, in solche Reihenfolgen die entsprechenden Daten von solchen Chemikalien einzubauen, von denen gründliche Forschungsergebnisse über ihr Verhalten in der intakten Pflanze und im Pflanze/Boden-System bekannt sind (Referenzchemikalien). Einige Testergebnisse werden sich zum Screening, also zu einer Vorab-Beurteilung nutzen lassen. So gibt eine hohe Umsatzrate Hinweise auf eine geringe Verweilzeit der Ausgangsverbindung im pflanzlichen Milieu und kann unter Heranziehung anderer Screening-Testergebnisse - beispielsweise aus dem abiotischen und dem aquatischen Bereich - zu einer Bewertung der Bedeutung dieser Substanz für die Umwelt führen.

Weitere Screeningtests auf dieser Ebene stellen die in der Literatur beschriebenen Elemente der Profilanalyse einer Prüfsubstanz dar ³⁾. Der Schnelltest mit pflanzlichen Zellkulturen ergänzt das Raster der bisher verfügbaren Tests, z.B. zur Untersuchung des: 1) Verhaltens in Säugetieren, 2) Akkumulierens in Wassertieren, 3) Akkumulierens in Wasserpflanzen, 4) Verhaltens in Klärschlamm, 5) Verhaltens im Kompost (mikrobieller Abbau), 6) Verhaltens in der Atmosphäre, 7) Verhaltens bei der Verbrennung ³⁾ insofern, als mit ihm nun auch Aussagen über das Verhalten in Zellkulturen höherer Pflanzen möglich werden (Abb. 2).

Abb. 2: Teilsystem für ein Raster profilanalytischer Testsysteme zur Bewertung des ökochemischen Verhaltens von Prüfsubstanzen (vgl. Fig. 1 aus Lit. 3)



3) F. Korte, D. Freitag, H. Geyer, W. Klein, A.G. Kraus, E. Lahaniatis;
Chemosphere 7 (1978) 79-102

Des weiteren ist die Festlegung der Substanz oder ihrer Metabolite in nicht extrahierbare Zellbestandteile (Bligh-Dyer-Gemisch) von Bedeutung. Ist dieser Anteil hoch ("nicht extrahierbare Rückstände"; vgl. Tabellen 2 - 6), sollten dazu weitere Untersuchungen durchgeführt werden, so über den Einbau in Zellwandbestandteile (z.B. Lignin, Pektine, Proteine etc.) und über die Bioverfügbarkeit. Eine hohe Bindungstendenz bedeutet Längerlebigkeit der Substanz bzw. ihrer Metabolite und stellt eine mögliche Kontaminationsquelle der Nahrungskette dar. Schlußfolgerungen in dieser Richtung lassen sich ebenfalls aus den Ergebnissen mit Pflanzenzellkulturen ableiten.

Zum Schluß ist zu erwähnen, welche zusätzlichen Umweltchemikalien bisher mit der geschilderten Schnelltest-Prozedur untersucht wurden. Es handelt sich um Monolinuron, Parathion, Dichlofluanid, Lindan, Hexachlorbenzol (Berlin), sowie um Benzo(a)pyren, Dibenz(a,h)anthrazen, Perylen und Harnstoff (Braunschweig) und um 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure, Benzo(a)pyren, DDT, DDA, Hexachlorbenzol (Freiburg).

7. Methodischer Teil

Im folgenden wird die mehrfach verbesserte Arbeitsvorschrift mitgeteilt, nach welcher die Ringuntersuchungsergebnisse erhalten wurden. Diese beschreibt genau den zuletzt erreichten Laboratoriumsstandard, nach dem die Versuchsergebnisse mit insbesondere PCP und DEHP erarbeitet wurden.

Zellkulturen

Die Stammsuspensionskulturen (Sojabohne, *Glycine max* L. Merrill cv. Mandarin bzw. Weizen, *Triticum sativum* L. cv. Heines Koga II) werden in 200 ml Erlenmeyer-Weithalskolben mit 40 ml B5-Nährmedium (s. Anlage 2) und 1 mg/l 2,4-D (Methanol) für Sojakulturen und 2 mg/l 2,4-D für Weizen unter Schütteln mit 110 Umdrehungen pro Minute bei 27 °C im Dunkeln herangezogen. Alle 7 bzw. 14 Tage werden 2 g Zellmaterial mit Hilfe eines löffelförmigen Siebes mit einer Maschenweite von 0,8 mm in neues Medium übergeimpft. Sojazellen werden in das Nährmedium eingeschwemmt, Weizenzellen nach Abtropfen des alten Nährmediums ohne Siebung überführt. Die Erlenmeyer-Kolben werden dann mit Alu-Folie (locker) oder Steristopfen verschlossen. Da der gesamte Inkubationszeitraum mit der Testchemikalie innerhalb der logarithmischen/linearen Wachstumsphase und nicht in der stationären Phase liegen sollte, wird der Wachstumsverlauf

der Suspensionskulturen durch die Bestimmung des Frischgewichts über die Passagenlänge hinweg verfolgt. Bei Soja-Zellen werden nach 7-tägiger Kulturzeit 10 - 14 g Endgewicht, bei Weizen nach 14-tägiger Kulturzeit 6 - 8 g erwartet.

Versuchsansatz und Radioaktivitätsapplikation

Zum Überimpftermin werden vier 200 ml-Stammkolben vereint. Aus diesen werden mit Hilfe des Einschwemmsiebs und eines Spatels je 2 g Zellmaterial in 10 Erlenmer-Kolben, die je 40 ml Nährmedium enthalten und zusammen autoklaviert worden waren, direkt eingewogen (nicht eingeschwemmt). Nach fünf bzw. zwölf Tagen Kulturzeit wird in drei Kolben die Lebensfähigkeit der Zellen durch 10-minütiges Erhitzen auf 100 °C unterbrochen. Diese drei und die übrigen sieben Kolben erhalten dann unter sterilen Bedingungen je 40 µl einer methanolischen ¹⁴C-Wirkstofflösung (ca. 1.000.000 dpm), so daß eine Wirkstoff-Endkonzentration im Nährmedium von 1 mg/l resultiert. Da in die Berechnung nur sechs Kolben mit lebenden Zellen eingehen, dient der siebte zur Sicherheit, falls ein Kolben der Serie durch äußere Einflüsse ausfällt.

Versuchsabbruch

Die Sojazellen werden am 7. Tag bzw. die Weizenzellen am 14. Tag nach Ausstrich aller Parallelen auf zwei Universalböden für Bakterien sowie für Pilze und Hefen zur Sterilitätskontrolle (Anlage 3) über eine Schlitzfilternutsche (Ø 6 cm) auf vorgewogenen Papierfiltern (Schwarzband) vom Nährmedium getrennt (Anlage 1) (Zellen gleichmäßig über das Filtrierpapier so verteilt, daß alle Schlitze von Zellmaterial abgedeckt sind) und bis zu einem Volumen von 100 ml (graduierter Standzylinder) kontinuierlich mit bidest. Wasser nachgewaschen. Sobald keine Flüssigkeit mehr abgeht, wird das feuchte Filter mit der Zellmasse gewogen und die Zellen in ein 100 ml-Schraubdeckelglas mit 40,5 ml Gemisch aus 13,5 ml Chloroform und 27,0 ml Methanol - enthalten in 50 ml-PÄ-Spritzflaschen - übergespült und bei -18 °C aufbewahrt. Dabei wurde ein Wassergehalt der Zellen von etwa 5 - 10 ml angenommen, um etwa auf das Mischungsverhältnis nach Bligh-Dyer zu kommen. Von der Nährlösung werden zweimal je 1 ml für die Radioaktivitätsmessung entnommen.

Extraktherstellung

Die unmittelbar dem Gefrierschrank entnommenen Zellproben werden im Schraubdeckelglas (dicht abgedeckt mit Alu-Folie) 5 min mit Ultraschall (Sonifier B 12, Micro Tip 6,5) unter Eiskühlung beschallt und anschließend über eine Schlitzfilternutsche (Schwarzband) abgesaugt. Nachgewaschen wird mit ca. 50 ml Bligh-Dyer- Gemisch (Chloroform : Methanol : Wasser = 1:2:0,8). Die Filtrate werden in einem graduierten 100 ml-Standzylinder aufgefangen. Nach Volumenbestimmung werden zweimal je 1 ml zur Radioaktivitätsbestimmung entnommen. Die im Rückstand enthaltene, nicht extrahierbare Radioaktivität wird durch Verbrennen bestimmt.

Extrakt- und Nährmedium-Weiterverarbeitung

Die homogenen Chloroform-Methanol-Wasser-Extrakte werden am Rotationsverdampfer bei maximal 40 °C Wasserbad vorsichtig eingeeengt (Kühler des Rotationsverdampfers -15 °C, Vakuum mindestens 30 Torr). Die verbleibenden feuchten Rückstände der Extrakte werden mit 3 ml Methanol/Chloroform (2:1) im Wasserbad bei 40 °C unter Ultraschall aufgenommen und für die Trennung in Metaboliten verwendet.

Zu 20 ml des Nährmediums werden im Meßzylinder 75 ml Methanol/Chloroform (2:1) hinzugefügt. Nach erfolgtem Durchschütteln wartet man eine Klärung der trüben Lösung im Kühlraum ab (bei Sojamedium am besten über Nacht, da größere Mengen sedimentieren). Bei Soja-Zellkulturen werden die Überstände abpipettiert und die ausgefällten Rückstände nochmals mit 47,5 ml Methanol/Chloroform/Wasser (2:1:0,8) extrahiert. Die Extrakte werden vereinigt und bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C am Rotationsverdampfer (Kühler -15 °C) bis fast zur Trockene eingeeengt, in 3 ml Methanol/Chloroform (2:1) unter Ultraschall aufgenommen und zur DC eingesetzt.

Wirkstoff- und Metabolitenverteilung

Entsprechend den in den einzelnen Extraktkonzentraten enthaltenen Radioaktivitäten werden je Platte 100 - 200 µl der sechs Parallelen in einem etwa je 15 mm breiten Band auf die Platte getüpfelt. Zuvor wird den Extrakten inaktive Ausgangsverbindung in einer Menge zugemischt, daß pro Auftragsband etwa 50 µg vorhanden sind. Ein Überspotten genügt nicht. Bis zu sechs Parallelansätze können auf eine Platte aufgetragen werden*. Zur Identifizie-

*Laufmittel für Pentachlorphenol: Diäthyläther/n-Hexan/Ameisensäure (30:70:4)

rung der einzelnen Radioaktivitäten werden die Platten mit Hilfe des Dünnschichtscanners analysiert. Die Identität der Ausgangsverbindung im Chromatogramm wird durch Betrachten unter UV-Licht gesichert. Nach den Radioaktivitätsverteilungen der Scanneraufzeichnung wird die gesamte Laufstrecke in Zonen unterteilt. Es werden voneinander getrennt: Der Bereich der unveränderten Testchemikalie (sie soll in dem gewählten, gut trennenden Laufmittel einen R_f von ungefähr 0,5 aufweisen), die Zone mit größerem R_f als die Ausgangsverbindung (weniger polare Metaboliten) und der Bereich mit kleinerem R_f einschließlich Startzone (polare Metaboliten). Diese Kieselgelzonen können leicht mit einer Rasierklinge direkt in Szintillationsgläschen abgekratzt und nach Zugabe von Szintillatorlösung im Szintillationszähler quantitativ vermessen werden. Auch eine Direktmessung der Radioaktivitätsverteilung auf der Dünnschichtplatte kann mit Hilfe eines DC- Scanners durchgeführt werden.

Auswertung

Die prozentuale Verteilung (Radioaktivität der Gesamtlaufstrecke gleich 100 %) in Ausgangswirkstoff, polare Metaboliten und weniger polare Metaboliten wird so pro jeweiligen Extrakt erhalten. Durch Umrechnung mit Bezug auf die jeweils gemessenen Radioaktivitäten pro Einzelextrakte (Nährmedium und Chloroform-Methanol-Wasser) werden die Metaboliten- und Ausgangsverbindungsanteile pro applizierter Gesamtmenge ermittelt. Durch Addition der entsprechenden Werte aus Nährmedium und Zellextrakt lassen sich die Gesamtanteile an Ausgangsverbindung, polaren und weniger polaren Metaboliten pro eingesetzte Radioaktivität ermitteln. Die Bilanzsumme abzüglich der Anteile an Ausgangsverbindung ergibt die Umsatzrate.

Die tatsächliche Umsatzrate sollte durch Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Kontrollversuchen exakter zu erhalten sein. Es ist jedoch dabei im Auge zu behalten, daß die Kontrolle unvermeidbar durch die Hitzeinaktivierung der Zellen (Lysierung) nicht mit den Parallelen des Hauptversuchs exakt übereinstimmt. Dennoch kann der Kontrollversuch extreme, nicht zellbedingte Einflüsse des Testsystems auf die Chemikalie aufdecken.

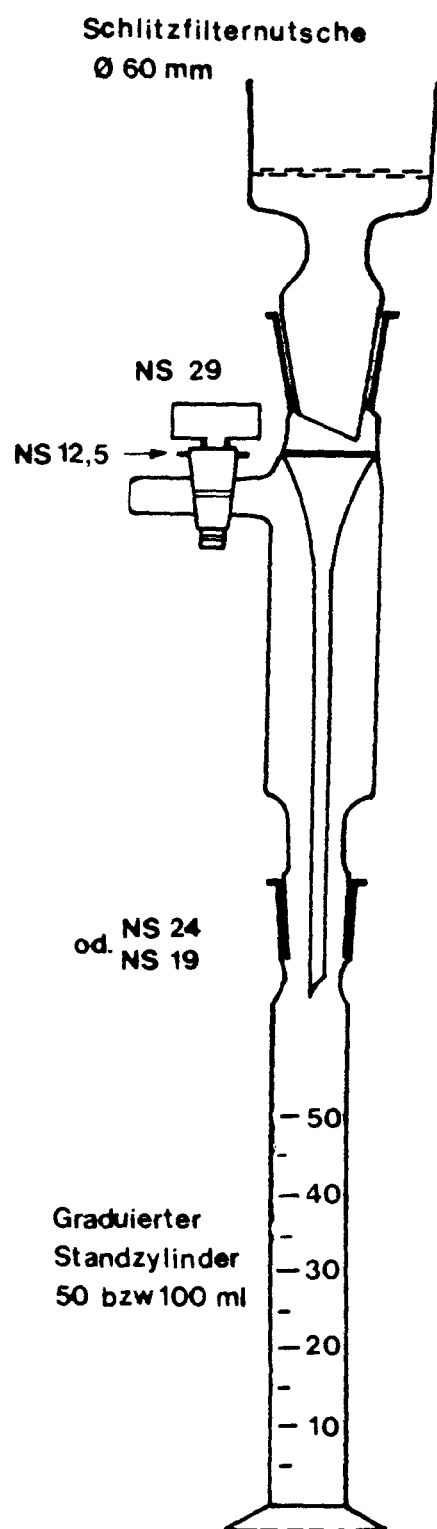
Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt am besten auf Bilanztabellen. Die Metabolisierbarkeit der Testverbindung wird in Form von % gebildeten polaren und weniger polaren Metaboliten einschließlich der nicht extrahierbaren

Anteile dargestellt (Formblätter Anlagen 4 - 6). Die Bilanzsumme abzüglich des Anteiles an Ausgangsverbindung ergibt die Umsatzrate. Die Verteilung der Radioaktivitäten (unspezifiziert) in Nährmedium und Zellextrakt und Darstellung zusammen mit dem Anteil an nicht extrahierbarer Radioaktivität (Anlage 4) dient nur zur übersichtlichen Kontrolle (Abweichung von der 100 %-Bilanz). Entsprechend den Formblättern werden von den Ergebnissen der sechs Parallelansätze und den drei Kontrollen die Mittelwerte \bar{x} gebildet. Dann wird die Standardabweichung von den Mittelwerten (s) errechnet und dann der Vertrauensbereich $s_{0,95}$, das Intervall also, in dem mit 95 % Wahrscheinlichkeit der Mittelwert der sechs Messungen liegt.

Danksagung

Die Autoren fühlen sich ihren technischen Mitarbeiterinnen Eva Hustede, Marion Ellies, Waltraud Fischer-Reinhardt für ihre außerordentlich präzise Durchführung der Tests zu großem Dank verpflichtet.



Anlage 2

B 5 - Medium für Weizen- und Sojazzellkulturen
pH 5,2 für Weizen und pH 5,5 für Soja
vor der Sterilisation

		auf 1000 ml
B 5 Stammlösung	A	100 ml
Spurenelementlösung	B	1 ml
Fe-EDTA-Lösung	C	5 ml
Vitaminlösung	D	10 ml
2,4 -D für Weizen	E	1 ml
2,4 -D für Soja	E	0,5 ml
Saccharose		20 g

B 5 Stammlösung A

auf 2000 ml	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3 g
KNO_3	50 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,68 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3 g
KJ	15 mg

B 5 Spurenelementlösung B

auf 100 ml	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	300 mg
H_3BO_3	300 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g

B 5 Fe-EDTA-Lösung C

auf 100 ml	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278 mg
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	372 mg

B 5-Vitaminlösung D

auf 100 ml	
Nicotinsäure	10 mg
Pyridoxin \cdot HCl	10 mg
Thiamin \cdot 2 HCl	100 mg
meso - Inosit	1 g

B 5 2,4-D Lösung E

auf 10 ml Methanol	
2,4 - D	20 mg

Anlage 3

Universalnährboden zur Sterilitätskontrolle auf Bakterien

1a) Standard I-Nähragar (Merck Nr. 7881)

37 g werden in 1 l dest. Wasser aufgelöst und sterilisiert.
10 - 15 ml pro Petrischale

1b) Caso-Agar (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Hefe-Agar)

30 g Caso-Bouillon Merck Nr. 5459 1 g Hefeextrakt 13 g Agar-Agar

In einem Liter bidest. Wasser heiß lösen und sterilisieren; 10 - 15 ml
pro Petrischale

2) Nährboden zur Sterilitätskontrolle auf Pilze und Hefen (Czapek-Dox-Agar)

30 g Saccharose 3 g Natriumnitrat 0,5 g Magnesiumsulfat 0,5 g Kaliumchlorid 0,01 g Eisen (II)-sulfat 1,0 g Di-Kaliumhydrogenphosphat 13 g Agar-Agar

In einem Liter bidest. Wasser heiß lösen und sterilisieren; 10 - 15 ml
pro Petrischale

Anlage 4

Darstellung der Testergebnisse

		% Aktivität 100 % = dpm			
Probe	Zellfrischgewicht g	Nährmedium	Zellextrakt (CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O)	nicht extrahierbar	Bilanzsumme
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
\bar{x}					
s					
Vertrauensbereich S = 0,95					
95 % Bereich					

Kontrolle

K ₁					
K ₂					
K ₃					
\bar{x}_K					
s					

Anlage 5

METABOLITENVERTEILUNG IN DEN FRAKTIONEN BEZOGEN AUF APPLIZIERTE RADIOAKTIVITÄT
IN STERILEN ZELLKULTUREN NACH ^{14}C -
VERSUCH: - APPLIKATION

dpm = 100 %

^o Radioaktivitätsanteil der gesamten Fraktion

PROBE											Kontrolle					
	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	s	Ver- trau- ensbe- reich (S=0,95)	95%-Bereich	K ₁	K ₂	K ₃	\bar{x}_K	s
NÄHRMEDIUM ^o																
AUSGANGSWIRKST. POL. METABOLITE WENIGER POL. METABOLITEN																
CHCl ₃ /MEOH/H ₂ O- EXTRAKT ^o																
AUSGANGSWIRKST. POL. METABOLITE WENIGER POL. METABOLITEN																

Anlage 6

UMSATZRATEN VON ^{14}C - IN STERILEN ZELLKULTUREN VERSUCH:

	% DER APPLIZIERTEN RADIOAKTIVITÄT				dpm = 100 %	
PROBE	AUSGANGS- WIRKSTOFF	POLARE METABO- LITENFRAKTION	WENIGER POLARE METABOLITENFRAKTION	NICHT EXTRAH- RÜCKSTÄNDE	UMSATZ- RATE	SUMME
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
\bar{x}						
s						
S=0,95						
95%Bereich						
*K ₁						
K ₂						
K ₃						
\bar{x} 3						
s						

* = Kontrolle, Zellen vor Applikation der ^{14}C -Aktivität abgetötet

Richtlinienentwurf

SCHNELLTEST ZUR ERMITTLUNG DER METABOLISMUS- UND END- ABBAULEISTUNG DURCH PFLANZLICHE ZELLKULTUREN GEGENÜBER ORGANISCHEN CHEMIKALIEN

O. Zugrunde liegende Arbeiten und Methoden

Diese Richtlinie wurde erstellt, nachdem die Eignung der Testvorschrift sowie die Reproduzierbarkeit der damit erhältlichen Ergebnisse in einem Interlaboratoriumsvergleich durch folgende drei Forschungsinstitutionen geprüft wurde: Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutzmittelforschung (BBA) Berlin; Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Institut für Pflanzenernährung und Bodenkunde, Braunschweig-Völkenrode; Albert-Ludwigs-Universität, Biologisches Institut II, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Freiburg.

I. Methode

I.1 Einleitung

Zweck dieses Testes ist, Daten über Metabolismus und Endabbau organischer Chemikalien durch Pflanzenzellen zu erarbeiten, um diese Prüfsubstanzen relativ zueinander zu bewerten.

Das Vermögen des pflanzlichen Organismus, Fremdchemikalien möglichst rasch und vollständig umzusetzen, sollte neben anderen ein Kriterium zur ökotoxikologischen Bewertung von Chemikalien sein. In der Screening-Stufe ist es nicht nötig, mit ganzen Pflanzen zu arbeiten, sondern von Vorteil, wenig aufwendige Schnellmethoden unter Verwendung von standardisierten Zellkulturen heranzuziehen. Unter den notwendigen sterilen Bedingungen kann der Einfluß von Mikroorganismen gänzlich ausgeschaltet werden. Durch das Arbeiten in wäßriger Suspension im Dunkeln werden weitere Effekte wie Aufnahme des Wirkstoffs durch die Cuticula und Wurzeln sowie Einfluß von UV-Licht auf die Chemikalie ausgeschaltet.

Die beschriebene in vitro-Methodik ermöglicht, Umsatzraten von organischen Chemikalien in zwei verschiedenen Pflanzenkulturen, einer monikotylen (Weizen) und einer dikotylen (Soja), unter reproduzierbaren Bedingungen kurzfristig zu bestimmen. Die Ergebnisse werden nicht immer mit den Abbau- und Metabolismusdaten gleichzusetzen sein, die mit Fremdchemikalien auf und in intakten Pflanzen in deren natürlicher Umgebung erhalten werden, da dort zusätzlich abiotische Einflüsse sowie Mikroorganismen einwirken. Die Testergebnisse spiegeln jedoch das Vermögen von Pflanzenzellen wider, Chemikalien entsprechend ihrem Strukturaufbau unterschiedlich schnell zu verstoffwechseln. Die Daten aus diesem Test können daher als eine Bewertungsgrundlage in einem Raster weiterer "Umwelttests" für die zu erwartenden Belastungen terrestrischer Ökosysteme durch die geprüften Chemikalien dienen.

1.2 Definitionen

Metabolisierung: Veränderung der Ausgangsverbindung, Bildung neuer organischer Verbindungen durch biochemische Reaktionen wie Oxydation, Reduktion, Konjugation, Eliminierung, Hydrolyse usw.. Endabbau: Mineralisierung zu den Endoxydationsprodukten, z.B. CO_2 , H_2O , Phosphat.

Umsatzrate: Anteil der pro Zeiteinheit (hier zwei Tage) gebildeten Metaboliten, einschließlich nicht extrahierbarer Rückstände, bezogen auf ursprünglich eingesetzte Menge an Ausgangswirkstoff.

Polare Metaboliten: Polare organische Umwandlungsprodukte, für die bei der Dünnschichtchromatographie (DC) auf Kieselgel ein geringerer R_f -Wert gemessen wird als für die Ausgangsverbindung.

Weniger polare Metaboliten: Umwandlungsprodukte, für die bei der DC ein größerer R_f -Wert gemessen wird als für die Ausgangsverbindung.

Nicht extrahierbare Rückstände: Rückstände, die nach Bligh-Dyer-Extraktion und Nachwaschen in dem Zellmaterial zurückbleiben.

1.3 Prinzip der Methode

Standardisierten Suspensionskulturen von Pflanzenzellen wird die zu untersuchende Chemikalie zugesetzt. Nach zweitägiger Inkubation wird in Pflanzenzellmasse und Nährlösung getrennt. Die Zellen werden extrahiert. Die Radioaktivitäten in Nährlösung, Zellextrakt und Zellrückstand werden zu einer Bilanz (Ausbeute an eingesetztem Wirkstoff) zusammengestellt.

Auftrennung der radioaktiven Substanzen aus Nährmedium und Zellextrakt mittels DC ergibt die Anteile an Ausgangswirkstoff, polare Metaboliten, weniger polare Metaboliten und Extraktionsrückstand, ggf. sind noch flüchtige Anteile sowie Metabolisierungsendprodukte durch Testvariante II erhältlich (s. Abschnitt 1.5.4). Durch Zusammenfassung aller im Versuchszeitraum umgesetzten Wirkstoffanteile ergibt sich die Umsatzrate des untersuchten Wirkstoffs.

1.4 Genauigkeit der Methode

1.4.1 Reproduzierbarkeit

Innerhalb eines Laboratoriums streuen die Einzelwerte einer Meßreihe in der Regel um ± 5 bis ± 8 % um den Mittelwert. In Interlaboratoriumsvergleichen lagen die Mittelwerte für die Umsatzraten innerhalb eines Streubereiches von 20 % (bezogen auf die jeweilige Umsatzgröße). Gute Reproduzierbarkeit kann nur bei strikter Einhaltung der GLP-Grundsätze erreicht werden.

1.4.2 Empfindlichkeit

Bei Einsatz von mindestens 5×10^5 dpm pro Ansatz können die unter 2. beschriebenen Daten erhalten werden.

1.4.3 Anwendbarkeit

Die Methode kann nur Verwendung finden, wenn radioaktiv (vorzugsweise ^{14}C -)markierte Verbindungen vorliegen. Wenn Bilanzsummen < 90 % erhalten werden, ist Testvariante II zu verwenden.

1.4.4 Standardisierbarkeit

Es werden Pflanzenzellkulturen verwendet, die über viele Jahre kultiviert wurden und somit als Standardkulturen angesehen werden können. Die Hauptvariante I wurde nach Ringtests zwischen drei Laboratorien standardisiert. Die Methode (Hauptvariante I) ist so zu eichen, daß die durch den Test bewirkte Radioaktivitätsverteilung für ^{14}C -PCP in folgenden Bereichen liegt:

Soja: Ausgangswirkstoff 24-32 %; polare Metabolitenfraktion 54-62 %; weniger polare Metabolitenfraktion 0,2-3,5 %; nicht extrahierbare Rückstände 5-13 %; Bilanzsumme 92-103 %.

Weizen: Ausgangswirkstoff 1,1-3,8 %; polare Metabolitenfraktion 49-61 %; weniger polare Metabolitenfraktion 0,1-0,5 %; nicht extrahierbare Rückstände 36-42 %; Bilanzsumme 90-98 %.

1.4.5 Untersuchungsaufwand

Ein erfahrenes Labor benötigt etwa 5 Personentage (technische Assistentin) und 1 Personentag (Wissenschaftler) für den reinen Rest ohne Einschluß der routinemäßigen Arbeiten (Erhalt und Ansatz der Kulturen, Geräewartung usw.).

1.5 Beschreibung der Methode

1.5.1 Vorbereitungen

Die Stammsuspensionskulturen werden in 100 ml Erlenmeyer-Weithalskolben⁺ mit 20 ml B5-Nährmedium mit 1 mg/l (Soja) und 2 mg/l 2,4-D (Weizen) unter Schütteln mit 110 Umdrehungen pro Minute bei 27° C im Dunkeln herangezogen. Alle 7 Tage (Soja) und alle 14 Tage (Weizen) wird 1 g Zellmaterial mit Hilfe eines löffelförmigen Siebes mit einer Maschenweite von 0,8 mm in neues Nährmedium übergeimpft. Sojazellen werden in das Nährmedium eingeschwemmt, Weizenzellen nach Abtropfen des alten Nährmediums ohne Siebung überführt. Die Erlenmeyer-Kolben werden dann mit Alu-Folie (locker) oder Sterilstopfen verschlossen.

1.5.1.1 Geräte

Clean bench (z.B. Ceag Schirp)

Rundschüttelgerät für 110 U/min (z.B. Infos, TU-1), mit mindestens 30 Halterungen für 100 ml- bzw. 200 ml-Erlenmeyer-Kolben, aufgestellt in einem thermostatisierten Raum;

oder Rundschüttler gleicher Leistung mit Wärmebox

Autoclav (z.B. Webeco)

Ultraschall-Gerät (z.B. Sonifier B 12, Micro Tip 6,5)

Rotationsverdampfer mit Aggregat zur Kühlung des Kühlmittels unter 0° C (z.B. Büchi)

+ Wahlweise kann entsprechend auch in 200 ml-Kolben mit 40 ml B5-Nährmedium und 2 g Zellmaterial gearbeitet werden.

Trockenschrank

Automatisches DC-Auftragegerät (z.B. Camag, Linomat III) (optional)

Dünnschichtscanner (z.B. Berthold Dünnschichtscanner II LB 2723)

Liquid Scintillation Counter (z.B. Beckmann LS 7000)

Verbrennungsautomat (z.B. Packard-Tri-Carb, Sample Oxidizer-306)

UV-Bestrahlungslampe für DC, 254 nm (z.B. Desaga UVIS)

Leitfähigkeitsmeßgerät (z.B. Metrohm Conductometer E 518).

1.5.1.2 Glasgeräte und Hilfsmittel

100 ml-Erlenmeyer-Kolben (Weithals)

Schlitznutschen 6 cm Ø

Absaugevorrichtung (gemäß Anlage 1)

Schraubdeckelgläser (Weithals, 50 bzw. 100 ml)

50 ml- bzw. 100 ml-Standzylinder mit Schliff, graduert

250 ml-Rundkolben, NS 29

50 ml-Spritzflaschen aus Polyäthylen

1 ml-Pipetten

10 - 20 µl-Pipetten

DC-Platten (z.B. 0,25 mm Kieselgel F₂₅₄, Merck auf Glas)

Industrie-Rasierklagen ('single edge industrial blades')

Filterpapier 7 cm Ø, Schwarzband, Ränder manuell hochgebogen

Verschlüsse für Erlenmeyer-Kolben (z.B. starkwandige Alufolie oder Sterilstopfen)

Natriumsieblöffel bzw. ähnliche Siebe von 0,8 mm Maschenweite (Edelstahl, Messing oder Bronze)

Röntgenfilme (z.B. Agfa Gevaert, Osray T 4 oder M 3).

Testvariante II, zusätzlich:

Membranfilter-Halter aus Edelstahl (Typ SM 16251, Satorius)

Membranfilter, Porengröße 0,2 µm (Typ SM 118-07, Format 25, Satorius)

Siliconstopfen

Siliconschläuche

Polyurethan(PU)-Schaumstopfen (35 mm Ø, 30 mm Länge, Dichte 50 mg/cm³)

Fritte Ø 30 mm, Porengröße Nr. 1 zur Aufnahme der PU-Stopfen

Absorptionsvorlagen als Wendel- oder Frittenwaschflaschen (Adsorptionsmittelvolumen 10 ml/Falle)

Mini-Pumpe (z.B. Leybold-Heraeus).

1.5.1.3 Testchemikalien

Die zu prüfenden Chemikalien müssen radioaktiv markierte organische Verbindungen sein, nach Möglichkeit ^{14}C -markiert; radiochemische Reinheit $\geq 98\%$.

Lösungen 1 mg/ml in Methanol oder gegebenenfalls Wasser. Bei Verwendung von 100 ml Erlenmeyer-Kolben mit 20 ml Nährmedium werden 20 µl Prüfchemikalie-Lösung (ca. 5×10^5 dpm) zugesetzt. Die Radioaktivitätsverdünnung der zu untersuchenden Probe auf die angegebenen Substanzkonzentrationen erfolgt mit nicht markierten Verbindungen einer Reinheit $\geq 99\%$.

1.5.1.4 Chemikalien

Chloroform p.A.

Methanol p.A.

Bligh-Dyer-Gemisch: Methanol/Chloroform/Wasser (2 : 1 : 0,8)

und andere Lösungsmittel für die DC entsprechend den gewählten Laufmitteln

Nährmedium B5 (gemäß Anlage 2)

Universalnährboden zur Sterilitätskontrolle auf Bakterien und Pilze (gemäß Anlage 3)

CO_2 -Absorptionsgemisch: Äthylenglykolmonomethyläther/Äthanolamin (2 : 1) für Testvariante II.

Szintillatorflüssigkeit auf Toluolbasis Quickszint-402; Testvariante II zusätzlich Minisolve-1.

1.5.2 Testbedingungen

Als Testobjekte werden Suspensionskulturen der Sojabohne (Glycine max L. Merrill cv. Mandarin) und des Weizens (Triticum sativum L. cv Heines Koga II) verwendet. Sie werden im Dunkeln auf einem Rundschüttler bei 110 U/min und 27°C kultiviert.

Da der gesamte Inkubationszeitraum mit der Testchemikalie innerhalb der logarithmischen/linearen Wachstumsphase und nicht in der stationären Phase liegen sollte, wird der Wachstumsverlauf der Suspensionskulturen durch die Bestimmung des Frischgewichts über die Passagenlänge hinweg verfolgt. Bei Sojazellen werden in 100 ml-Kolben 5 - 7 g und bei Weizenkulturen 2,5 - 4 g Endgewicht erwartet.

Eine einfache Methode zur Ermittlung des Wachstumsverlaufs stellt die Messung der Leitfähigkeit des Nährmediums dar, wobei sich deren

Kurvenverlauf spiegelbildlich zu dem der Gewichtszunahme der Zellkultur verhält.

Die Überprüfung der Sterilität der Kulturen erfolgt an dem Überimpftermin für die 10 Kolben des Versuches sowie nach der 48stündigen Inkubation mit der Testchemikalie direkt vor dem Abnutschen des Zellmaterials. Aus den Kolben werden jeweils Ausstriche auf zwei Universalnährböden für Bakterien sowie für Pilze und Hefen gemacht.

1.5.3 Durchführung des Tests; Hauptvariante (I)

1.5.3.1 Versuchsansatz und Radioaktivitätsapplikation

Das Volumen von 20 ml Nährmedium-Lösung je 100 ml-Kolben wird (beispielsweise aus einer Vorratslösung z.B. mit Kippautomatik) eingefüllt und anschließend im Autoklaven sterilisiert. Zum Überimpftermin werden vier 100 ml-Stammkolben vereint. Aus diesen wird mit Hilfe des Einschwemmsiebs und eines Spatels jeweils 1 g Zellmaterial in 10 Erlenmeyer-Kolben direkt eingewogen (nicht eingeschwemmt; vgl. dazu auch 1.5.1). Nach fünf Tagen Kulturzeit (Soja) bzw. zwölf Tagen (Weizen) wird in drei Kolben die Lebensfähigkeit der Zellen unterbrochen, indem die Kolben 10 Minuten (z.B. in einen Trockenschrank) auf 100° C (Kolbeninnentemperatur) gebracht werden. Diese drei und die sieben übrigen Kolben erhalten dann unter sterilen Bedingungen je 20 µl einer methanolischen ¹⁴C-Testsubstanzlösung (ca. 5 x 10⁵ dpm), so daß eine Endkonzentration im Nährmedium von 1 mg/l resultiert. Da in die Berechnung nur sechs Kolben mit lebenden Zellen eingehen, dient der siebente zur Sicherheit, falls ein Kolben der Serie durch äußere Einflüsse ausfällt.

1.5.3.2 Versuchsabbruch

Die Sojazellen werden am 7. Tag, die Weizenzellen am 14. Tag über die Schlitzfilternutsche auf vorgewogenen Papierfiltern vom Nährmedium getrennt (Anl. 1). Dazu werden die Zellen gleichmäßig über das Filterpapier so verteilt, daß alle Schlitzlöcher von Zellmaterial abgedeckt sind, und bis zu einem Volumen von 50 ml (graduierter Standzylinder) kontinuierlich mit bidest. Wasser nachgewaschen. Sobald keine Flüssigkeit mehr abgeht, wird das feuchte Filter mit der Zellmasse gewogen und die Zellen in ein 50 ml-Schraubdeckelglas mit 20 ml Gemisch aus CHCl₃ und CH₃OH (1+2) - enthalten in 50 ml-Polyäthylen-

spritzflaschen - übergespült und bei -18°C aufbewahrt. Dabei wurde ein Wassergehalt der Sojazellen von etwa 5 ml und bei Weizenzellen von etwa 2,5 ml angenommen, um auf das Mischungsverhältnis nach Bligh-Dyer zu kommen. Von der Nährlösung werden zweimal je 1 ml für die Radioaktivitätsmessung entnommen.

1.5.3.3 Extraktherstellung

Die unmittelbar dem Gefrierschrank entnommenen Zellproben werden im Schraubdeckelglas (dicht abgedeckt mit Alu-Folie) 5 min mit Ultraschall unter Eiskühlung beschallt und anschließend über eine Schlitznutsche mit vorgewogenem Schwarzband-Filter abgesaugt. Nachgewaschen wird mit 25 ml Bligh-Dyer-Gemisch (Methanol/Chloroform/Wasser; 2:1:0,8). Die Filtrate werden in einem graduierten 50 ml-Standzylinder aufgefangen. Nach Volumenbestimmung werden zweimal je 1 ml zur Radioaktivitätsbestimmung entnommen.

Die Radioaktivität in dem nicht extrahierbaren Rückstand wird durch Verbrennen in einem Verbrennungsautomaten bestimmt.

1.5.3.4 Extrakt- und Nährmedium-Weiterverarbeitung für die Differenzierung in Ausgangschemikalie und Metaboliten

Zur Vermeidung von Artefaktbildungen, die durch Einengungsschritte entstehen können, werden die homogenen Chloroform-Methanol-Wasser-Extrakte und die Nährmedien direkt mit einem automatisch arbeitenden Auftragegerät auf DC-Platten aufgetragen und nach Trennung* in Ausgangsverbindung und Metaboliten differenziert. Entsprechend den in den einzelnen Extrakten enthaltenen Radioaktivitäten werden je Platte 100 - 1000 μl der Parallelen in einem etwa je 10 - 30 mm breiten Band auf die Platten automatisch aufgetragen. Zuvor wird den Extrakten inaktive Ausgangsverbindung in einer Menge zugemischt, daß pro Auftragbande etwa 50 μg vorhanden sind. Ein nachträgliches Auftragen der Testchemikalienlösung auf denselben Startbereich ist zu vermeiden.

*) Laufmittel für Pentachlorphenol: Diäthyläther/n-Hexan/Ameisensäure (30:70:4)

Steht kein automatisch arbeitendes Auftragegerät zur Verfügung, werden die homogenen Chloroform-Methanol-Wasser-Extrakte am Rotationsverdampfer bei maximal 40° C (Wasserbad) vorsichtig eingeeengt (Kühler des Rotationsverdampfers -15° C, Vakuum mindestens 30 Torr). Die verbleibenden feuchten Rückstände der Extrakte werden mit 1 - 2 ml Methanol/Chloroform (2 : 1) im Wasserbad bei 40° C unter Ultraschall aufgenommen und für die Trennung in Metaboliten verwendet.

Im Falle des Nährmediums werden 10 ml in einem 100 ml-Rundkolben mit 37 ml Methanol/Chloroform (2 : 1) versetzt und das Gemisch bei einer Wasserbadtemperatur von 40° C am Rotationsverdampfer (Kühler -15° C) (bei 15 -30 Torr) bis fast zur Trockene eingeeengt, in 1 -2 ml Methanol/Chloroform-Gemisch (2 : 1) unter Ultraschall aufgenommen und zur DC eingesetzt.

Zur Identifizierung der einzelnen Radioaktivitäten werden die Platten mit Hilfe des Dünnschichtscanners oder durch Autoradiographie analysiert. Die Identität der Ausgangsverbindung im Chromatogramm wird durch Betrachten unter UV-Licht gesichert. Nach den Radioaktivitätsverteilungen wird die gesamte Laufstrecke in Zonen unterteilt. Es werden voneinander getrennt: Der Bereich der unveränderten Testchemikalie (sie soll in dem gewählten, gut trennenden Laufmittel einen R_f von ungefähr 0,5 aufweisen), die Zone mit größerem R_f als die Ausgangsverbindung (weniger polare Metaboliten) und der Bereich mit kleinerem R_f einschließlich Startzone (polare Metaboliten). Diese Kieselgelzonen können leicht mit einer Rasierklinge direkt in Szintillationsgläschen abgekratzt und nach Zugabe von Szintillatorlösung im Szintillationszähler quantitativ vermessen werden.⁺

1.5.3.5 Auswertung

Die prozentuale Verteilung (Radioaktivität der Gesamtlaufstrecke gleich 100 %) in Ausgangswirkstoff, polare Metaboliten und weniger polare Metaboliten (s. 1.2) wird so pro jeweiligen Extrakt erhalten. Durch Umrechnung mit Bezug auf die jeweils gemessenen Radioaktivitäts-

⁺ Auch die Direktvermessung der Radioaktivitäten auf der DC-Platte kann nach entsprechenden Eineichungen alternativ durchgeführt werden.

ten pro Einzelextrakte (Nährmedium und Chloroform-Methanol-Wasser) werden die Metaboliten- und Ausgangsverbindungsanteile pro applizierter Gesamtmenge ermittelt. Durch Addition der entsprechenden Werte aus Nährmedium und Zellextrakt (Anlagen 5 und 6) lassen sich die Gesamtanteile an Ausgangsverbindung, polaren und weniger polaren Metaboliten pro eingesetzte Radioaktivität ermitteln (Anlage 7). Die Bilanzsumme abzüglich der Anteile an Ausgangsverbindung ergibt die Umsatzrate. Die tatsächliche Umsatzrate sollte durch Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Kontrollversuchen exakter zu erhalten sein. Es ist jedoch dabei im Auge zu behalten, daß die Kontrolle unvermeidbar durch die Hitzeinaktivierung der Zellen (Lysierung) nicht mit den Parallelen des Hauptversuchs exakt übereinstimmt. Dennoch kann der Kontrollversuch extreme, nicht zellbedingte Einflüsse des Testsystems auf die Chemikalie aufdecken.

1.5.4 Durchführung des Tests (Variante II)

Wenn die Ausgangsverbindung relativ flüchtig ist (Bilanzsumme ≤ 90 %), wenn mit der Bildung flüchtiger organischer, die radioaktive Markierung tragende Metaboliten zu rechnen ist, sowie wenn die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ erwartet wird, muß unter geschlossenen, kontrolliert belüfteten Bedingungen gearbeitet werden. Die anstelle der unter 1.5.3.1 beschriebenen Kolben zu verwendende Apparatur ist in der Anlage 5 dargestellt. Nach der Radioaktivitätsapplikation werden die Erlenmeyer-Kolben mit sterilen Silikonstopfen mit Trichter zur Aufnahme eines Polyurethan-Schaumstopfens sowie Belüftungsschläuchen mit Sterilfilter versehen. Der durch eine Saugpumpe erzeugte Belüftungsstrom passiert zwei Absorptionsvorlagen, die zur Bindung von $^{14}\text{CO}_2$ mit je 10 ml des CO_2 -Absorptionsgemisches beschickt sind. Die Belüftungsrate wird auf einen Luftwechsel von einem Erlenmeyervolumen pro Minute eingestellt. Zum Versuchsende und nach Volumenausgleich mit Äthylenglykolmonomethyläther werden 1 ml der Absorptionslösungen im Scintillationszähler vermessen. Die Radioaktivität im Polyurethan-Schaumstopfen wird nach Soxhlet-Extraktion bestimmt.

Die übrigen unter 1.5.3 beschriebenen Maßnahmen bleiben unverändert. In die Daten der nicht flüchtigen Anteile von 1.5.3.6 werden die Daten der flüchtigen Anteile Ausgangswirkstoff und Metaboliten sowie gemessenes $^{14}\text{CO}_2$ einbezogen.

2. Ergebnisse

2.1 Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in tabellarischer Form. Die Metabolisierbarkeit der Testverbindung wird in Form von % gebildeten polaren und weniger polaren Metaboliten einschließlich der nicht extrahierbaren Anteile dargestellt (Formblätter Anlagen 5 - 7). Die Bilanzsumme abzüglich des Anteiles an Ausgangsverbindung ergibt die Umsatzrate. Die Verteilung der Radioaktivitäten (unspezifiziert) in Nährmedium und Zellextrakt und Darstellung zusammen mit dem Anteil an nicht extrahierbarer Radioaktivität (Anlage 5) dient nur zur übersichtlichen Kontrolle (Abweichung von der 100 % Bilanz). Entsprechend den Formblättern werden von den Ergebnissen der sechs Parallelansätze und den drei Kontrollen die Mittelwerte \bar{x} gebildet. Dann wird die Standardabweichung s von den Mittelwerten errechnet und schließlich der Vertrauensbereich, das Intervall also, in dem mit 95 % Wahrscheinlichkeit der Mittelwert der sechs Messungen liegt (Berechnungsbeispiel s. Anlage 8).

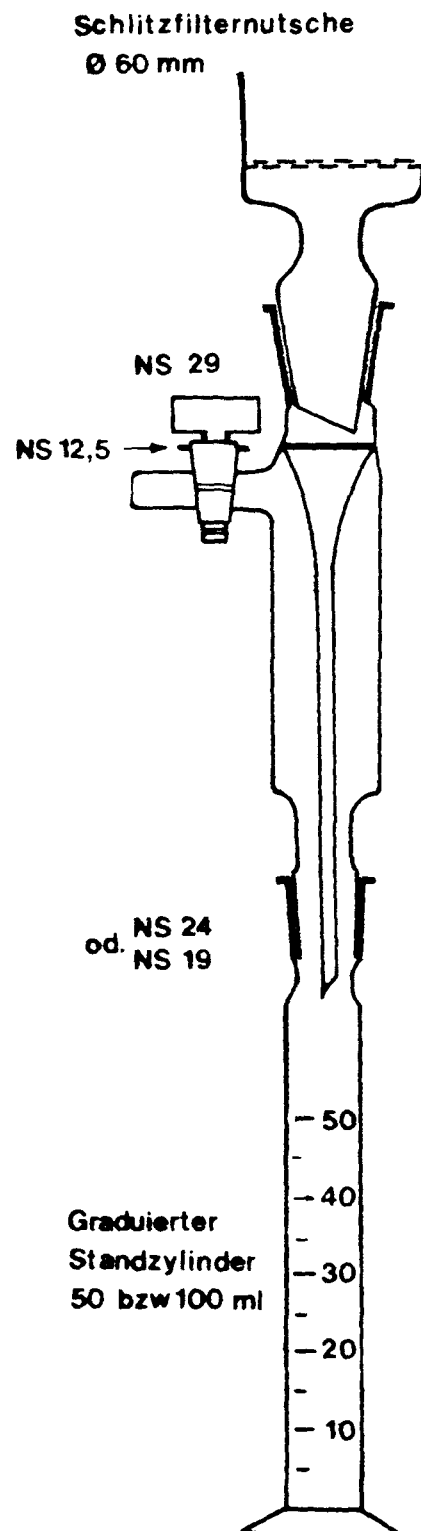
2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die geprüften Chemikalien werden in der Reihenfolge ihrer Umsatzraten in eine Datenreihe eingeordnet, in welcher sich auch bzgl. ihres Verhaltens in anderen Testsystemen (z.B. Ganzpflanzen, Boden, Wasser, Tier) untersuchte Referenzchemikalien befinden. Anhand der Datenverhältnisse der geprüften Chemikalien aus dem Screeningtest im Vergleich zu den Referenzchemikalien und jenen weiteren Informationen aus anderen Testsystemen lassen sich Schlüsse auf das zu erwartende Verhalten der Testsubstanz in der Umwelt ziehen. Eine hohe Umsatzrate in diesem Zellkultursystem deutet auf eine geringe Persistenz einer Chemikalie im pflanzlichen Milieu hin.

Falls die in diesem Test erhaltenen Ergebnisse nicht mit denen aus vorstehend erwähnten anderen Tests eine Beurteilung ermöglichen, sollte z.B. ein Bilanzversuch an intakten Pflanzen durchgeführt werden.

Beim Vorliegen eines größeren Anteils an weniger polaren Metaboliten (10 %) sollte nach Möglichkeit die Hauptkomponente identifiziert werden.

Anlage 1



Anlage 2

B 5 - Medium für Weizen- und Sojazzellkulturen
pH 5,2 für Weizen und pH 5,5 für Soja
vor der Sterilisation

auf 1000 ml		
B 5 Stammlösung	A	100 ml
Spurenelementlösung	B	1 ml
Fe-EDTA-Lösung	C	5 ml
Vitaminlösung	D	10 ml
2,4 -D für Weizen	E	1 ml
2,4 -D für Soja	E	0,5 ml
Saccharose		20 g

B 5 Stammlösung A

auf 2000 ml	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3 g
KNO_3	50 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,68 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3 g
KJ	15 mg

B 5 Spurenelementlösung B

auf 100 ml	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	25 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	300 mg
H_3BO_3	300 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1 g

B 5 Fe-EDTA-Lösung C

auf 100 ml	
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278 mg
$\text{Na}_2 \text{EDTA}$	372 mg

B 5-Vitaminlösung D

auf 100 ml	
Nicotinsäure	10 mg
Pyridoxin $\cdot \text{HCl}$	10 mg
Thiamin $\cdot 2 \text{HCl}$	100 mg
meso - Inosit	1 g

B 5 2,4-D Lösung E

auf 10 ml Methanol	
2,4 - D	20 mg

Anlage 3

Universalnährboden zur Sterilitätskontrolle auf Bakterien

1a) Standard I-Nähragar (Merck Nr. 7881)

37 g werden in 1 l dest. Wasser aufgelöst und sterilisiert.
10 - 15 ml pro Petrischale

1b) Caso-Agar (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Hefe-Agar)

30 g Caso-Bouillon Merck Nr. 5459

1 g Hefeextrakt

13 g Agar-Agar

In einem Liter bidest. Wasser heiß lösen und sterilisieren; 10 - 15 ml
pro Petrischale

2) Nährboden zur Sterilitätskontrolle auf Pilze und Hefen (Czapek-Dox-Agar)

30 g Saccharose

3 g Natriumnitrat

0,5 g Magnesiumsulfat

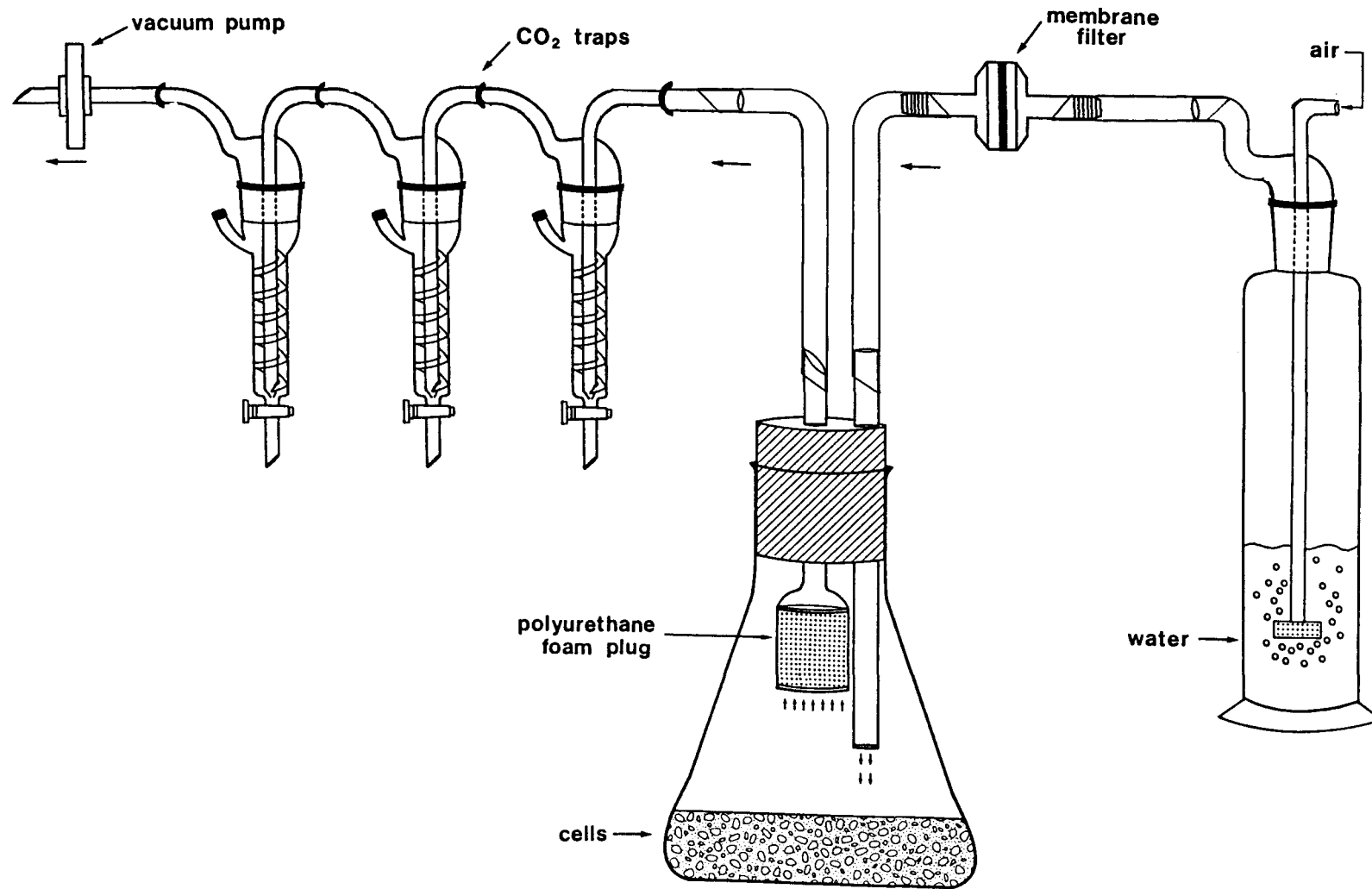
0,5 g Kaliumchlorid

0,01 g Eisen (II)-sulfat

1,0 g Di-Kaliumhydrogenphosphat

13 g Agar-Agar

In einem Liter bidest. Wasser heiß lösen und sterilisieren; 10 - 15 ml
pro Petrischale



Anlage 4 Geschlossenes System zur Erfassung flüchtiger Wirkstoff- und Metabolitenanteile

Anlage 5

Darstellung der Testergebnisse

		% Aktivität 100 % = dpm			
Probe	Zellfrisch- gewicht g	Nährmedium	Zellextrakt (CHCl ₃ /CH ₃ OH/H ₂ O)	nicht ex- trahierbar	Bilanz- summe
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
\bar{x}					
s					
Vertrauens- bereich S = 0,95					
95 % Bereich					

Kontrolle

K ₁					
K ₂					
K ₃					
\bar{x}_K					
s					

Anlage 6

METABOLITENVERTEILUNG IN DEN FRAKTIONEN BEZOGEN AUF APPLIZIERTE RADIOAKTIVITÄT

dpm = 100 %

IN STERILEN ZELLKULTUREN NACH ^{14}C -

- APPLIKATION

VERSUCH:

° Radioaktivitätsanteil der gesamten Fraktion

Kontrolle

PROBE	1	2	3	4	5	6	7	\bar{x}	s	Ver- trau- ensbe- reich (S=0,95)	95%-Bereich	K ₁	K ₂	K ₃	\bar{x}_K	\bar{s}
NÄHRMEDIUM °																
AUSGANGSWIRKST. POL. METABOLITE WENIGER POL. METABOLITEN																
CHCl ₃ /MEOH/H ₂ O- EXTRAKT °																
AUSGANGSWIRKST. POL. METABOLITE WENIGER POL. METABOLITEN																

Anlage 7

UMSATZRATEN VON ^{14}C - IN STERILEN ZELLKULTUREN VERSUCH:

PROBE	% DER APPLIZIERTEN RADIOAKTIVITÄT				dpm = 100 %	
	AUSGANGS- WIRKSTOFF	POLARE METABO- LITENFRAKTION	WENIGER POLARE METABOLITENFRAKTION	NICHT EXTRAH- RÜCKSTÄNDE	UMSATZ- RATE	SUMME
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
\bar{x}						
s						
s=0,95						
95% Bereich						
* K ₁						
K ₂						
K ₃						
\bar{x} 3						
s						

* = Kontrolle, Zellen vor Applikation der ^{14}C -Aktivität abgetötet

Anlage 8

Berechnung des Vertrauensbereiches und des 95 %-Bereiches

$$\text{Vertrauensbereich (S = 0,95)} = \frac{s \cdot t}{\sqrt{6}} \quad t = 6-1 \text{ (95 \%)}$$

Beispiel: 6 Messungen, Mittelwert $\bar{x} = 75,55 \%$

Standardabweichung

mit (n-1) Gewichtungen $s = 3,26 \%$

$$\text{Vertrauensbereich (S = 0,95)} \quad \frac{s \cdot t}{\sqrt{6}} = \frac{3,26 \cdot 2,57}{\sqrt{6}} = 3,42$$

Der Mittelwert besitzt demnach einen Vertrauensbereich

$$\text{von } 75,55 \pm 3,42 \%$$

Mit 95 % Wahrscheinlichkeit liegt der Mittelwert der Messungen im Bereich
72,13 % und 78,97 %.

